

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

**Klonierung und rekombinante Expression
der KlenTaq DNA Polymerase in
*Pichia pastoris***

Freya Körtje
Hamburg im Januar 2020

- | | |
|-----------------|---|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Stephan Noll
(HAW Hamburg) |
| 2. Gutachterin: | Prof. Dr. Gesine Cornelissen
(HAW Hamburg) |

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

Autorin:

Freya Körtje

Matrikelnummer 



1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Noll (HAW Hamburg)
2. Gutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ferner sind die verwendeten Tabellen, Grafiken, Bilder und andere Materialien richtig zitiert, oder selbstständig erstellt worden. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle gemäß wissenschaftlichen Zitierregeln kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form in keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

(Freya Körtje)

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels einem *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) Expressionsstamm die KlenTaq DNA Polymerase rekombinant zu exprimieren. Die Transkription des Zielgens wurde unter Kontrolle des Alkohol-Oxidase 1 Promotors gestellt. Dies ist ein sehr starker *P. pastoris* Promotor, welcher durch Methanol in Abwesenheit von Glucose oder Glycerin induziert werden kann.

Zunächst wurde der Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq durch *Golden Gate* (GG) Klonierung konstruiert, in einen *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm transformiert und die Gensequenz durch Polymerase-Kettenreaktion (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) und Sanger-Sequenzierung überprüft.

Um *P. pastoris* mit diesem Expressionsvektor transformieren zu können, wurde dieser durch Restriktionsverdau linearisiert.

Sowohl die Transformation von *E. coli*, als auch *P. pastoris* erfolgte mittels Elektroporation.

Der gewünschte Einbau des Vektors in das *P. pastoris* Genom wurde mittels PCR und Sanger-Sequenzierung bestätigt.

Durch *small-scale* Expression und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte bei den so überprüften Klonen nachgewiesen werden, dass die KlenTaq DNA Polymerase extrazellulär exprimiert wurde.

Des Weiteren lassen die Charakterisierung der KlenTaq DNA Polymerase durch Teilsequenzierung der Gensequenz und die Aufreinigung über einen N-terminalen His-tag auf eine erfolgreiche Expression schließen.

Durch Analyse der exprimierten KlenTaq DNA Polymerase auf DNA-Polymeraseaktivität konnte keine Funktionalität nachgewiesen werden. In weiteren Arbeiten sollte daran geforscht werden, die DNA-Polymeraseaktivität nachzuweisen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Ausarbeitung unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Noll, der die Bachelorarbeit betreut und begutachtet hat sowie mit seinen hilfreichen Anregungen und der konstruktiven Kritik bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Cornelissen für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Bei Herrn Schiffel bedanke ich mich für die engagierte Hilfe und die hilfreichen Ratschläge, sowie der Unterstützung bei der Ausführung der praktischen Arbeiten.

Abschließend möchte ich mich bei Lisa Michel und meinen Eltern für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Expressionssysteme im Überblick	1
1.2 Ziel der Arbeit	1
2 Theorie	5
2.1 Expressionssystem <i>Pichia pastoris</i>	5
2.2 Der Methanol-Metabolismus von <i>Pichia pastoris</i>	6
2.3 AOX1 und AOX2	7
2.4 KlenTaq DNA Polymerase	8
3 Material	9
3.1 Geräte	9
3.2 Chemikalien	12
3.3 Organismen	16
3.4 Plasmide	17
3.5 Enzyme	17
3.6 Primer	18
3.7 Lösungen, Puffer und DNA-Ladder	19
3.8 Nährmedien	22
3.9 Kits	23
4 Methoden	24
4.1 Zellaufzucht	24
4.1.1 Zellaufzucht in Fest- bzw. Flüssigmedium	24
4.1.2 <i>Small-scale</i> Expression in 6-well-Zellkulturplatten	25
4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung	27
4.2.1 Absorptionsmessung zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
4.2.2 Bestimmung der optischen Dichte	27
4.3 Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation	27
4.3.1 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i>	27
4.3.2 Herstellung elektrokompenter <i>P. pastoris</i>	28
4.3.3 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i>	28
4.3.4 Transformation elektrokompenter <i>P. pastoris</i>	29
4.4 DNA-Isolierung	30
4.4.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	30
4.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>P. pastoris</i>	30
4.5 DNA-Linearisierung	30
4.6 DNA-Fällung	31

4.7	<i>Golden Gate</i> Klonierung	31
4.8	Check PCR	32
4.9	Aufreinigung und Pufferwechsel	36
4.9.1	Aufreinigung der PCR-Produkte	36
4.9.2	Aufreinigung der KlenTaq DNA Polymerase mittels Ni-NTA <i>magnetic beads</i>	36
4.9.3	Pufferwechsel von Proteinlösungen	36
4.10	Ultraschallaufschluss	36
4.11	Gelelektrophoresen	36
4.11.1	Agarose-Gelelektrophorese	36
4.11.2	SDS-PAGE	37
4.12	Sequenzierung der Transformanden	38
4.13	Analyse, Visualisierung und Auswertung der DNA-Sequenzen und Plasmidkarten	39
5	Ergebnisse	40
5.1	Planung der Expressionskassette	40
5.2	Auxotrophie-Nachweis von <i>P. pastoris</i> BSY12MS	41
5.3	Isolierung des Plasmid pBSY2H4 (bisy, Hofstätten/Raab) aus <i>E. coli</i> JM109	42
5.4	<i>Golden Gate</i> Klonierung	44
5.5	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> 5-alpha	46
5.6	Isolierung des Plasmid pBSY2H4_KlenTaq aus <i>E. coli</i> 5-alpha	48
5.7	Linearisierung des Plasmid pBSY2H4_KlenTaq	48
5.8	Transformation elektrokompenter <i>P. pastoris</i>	49
5.8.1	Herstellung elektrokompenter <i>P. pastoris</i>	49
5.8.2	Transformation <i>P. pastoris</i>	51
5.9	Genomische Charakterisierung von Expressionsstämmen	54
5.9.1	Teilsequenzierung des Klon 1	57
5.9.2	Teilsequenzierung des <i>P. pastoris</i> Genoms	58
5.10	Expression KlenTaq DNA Polymerase	59
5.11	Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie	64
5.12	Kontrolle des Pufferwechsels mittels SDS-PAGE	66
5.13	Funktionale Analyse der KlenTaq DNA Polymerase	68
6	Diskussion	70
6.1	Klonierung	70
6.2	Rekombinante Expression	71
6.3	Fazit und Ausblick	73
	Literaturverzeichnis	74
A	Anhang	i
A.1	Sequenzierungsergebnisse KlenTaq DNA Polymerase	i
A.1.1	Alignment der originalen KlenTaq DNA Polymerase und der codon-optimierten KlenTaq DNA Polymerase	i

A.1.2	Alignment der C-terminalen Gensequenz der KlenTaq DNA Polymerase (Primer 17)	iv
A.1.3	Sequenzierungsreport der C-terminalen Gensequenz der KlenTaq DNA Polymerase (Primer 17)	vi
A.2	Sequenzierungsergebnisse <i>P. pastoris</i> WT	ix
A.2.1	Alignment der <i>P. pastoris</i> BSY12MS und <i>P. pastoris</i> BSYBG11 Gensequenzen	ix
A.2.2	Alignment der <i>P. pastoris</i> BSY12MS Gensequenz (Primer 83)	x
A.2.3	Sequenzierungsreport der <i>P. pastoris</i> BSY12MS Gensequenz (Primer 83)	xi
A.2.4	Alignment der <i>P. pastoris</i> BSY12MS Gensequenz (Primer 82)	xiii
A.2.5	Sequenzierungsreport der <i>P. pastoris</i> BSY12MS Gensequenz (Primer 82)	xiv
A.2.6	Alignment der <i>P. pastoris</i> BSY12MS Gensequenz (Primer 18)	xvi
A.2.7	Sequenzierungsreport der <i>P. pastoris</i> BSY12MS Gensequenz (Primer 18)	xviii
A.3	Sequenzierungsergebnisse Übergang gDNA von <i>P. pastoris</i> und integriertem Vektor im pAOX1-Lokus	xxi
A.3.1	Alignment der linken Flanke (Primer 18)	xxi
A.3.2	Sequenzierungsreport der linken Flanke (Primer 18)	xxiii
A.3.3	Alignment der linken Flanke (Primer 19)	xxvi
A.3.4	Sequenzierungsreport der linken Flanke (Primer 19)	xxviii
A.3.5	Alignment der rechten Flanke (Primer 20)	xxxi
A.3.6	Sequenzierungsreport der rechten Flanke (Primer 20)	xxxiii

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
<i>Amp^R</i>	Ampicillin-Resistenzgen
AOX	Alkoholoxidase
AOX-TT	Alkoholoxidase-Terminator
AOX1	Alkoholoxidase 1
AOX2	Alkoholoxidase 2
BMG1	<i>Buffered minimal glucose</i> ; enthält 1% Glucose
BMG2	<i>Buffered minimal glucose</i> ; enthält 2% Glucose
BMM1	<i>Buffered minimal methanol</i> ; enthält 1% Methanol
BMM5	<i>Buffered minimal methanol</i> ; enthält 5% Methanol
bp	Basenpaare
CAT	Katalase
DAK	Dihydroxyacetonkinase
DAS	Dihydroxyaceton synthase
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	3% Ethylen Glycol, 5% DMSO, 1 M Sorbitol
EtNa	Et für Ethanol, Na für Natriumhydroxid
F _{1,6} BP	Fructose-1,6-bisphosphat
F ₆ P	Fructose-6-phosphat
FBA	Fructose-1,6-bisphosphataldolase
FBP	Fructose-1,6-bisphosphatase
FDH 1	Formiatdehydrogenase 1
FDH	Formiatdehydrogenase
FGH	S-Formylglutathionhydrolase
FLD	Formaldehyddehydrogenase
FMS1-2	<i>Polyamine oxidase, converts spermine to spermidine</i>
fwd	<i>Forward</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
gDNA	Genomische DNA
GG	<i>Golden Gate</i>
GOI	<i>Gene of Interest</i>
GSH	Glutathion
His	Histidin
Kan	Kanamycin
<i>Kan^R</i>	Kanamycin-Resistenzgen
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MFS	Methylformiatsynthase
Mut ^S	<i>Methanol utilization slow</i>
MWCO	Molekulargewicht-Cut-off
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NK	Negativ-Kontrolle
OD	Optische Dichte
ORI	<i>Origin of replication</i>
pAOX	AOX-Promotor
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
P _i	Phosphat
PK	Positiv-Kontrolle
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PPB	<i>Potassium Phosphate Buffer</i>
PPP	Pentosephosphatweg
pUC ORI	ColE1 Replikationsursprung
PYR	Pyruvat
rev	<i>Reverse</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	...	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Tricarbonsäurezyklus
TPI	Triosephosphatisomerase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

WT	Wildtyp
Xu ₅ P	D-Xylulose-5-phosphat
YNB	Yeast nitrogen base
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>

Abbildungsverzeichnis

1.1	Simulation des bestellten Genkonstrukts	2
1.2	Schematische Darstellung der <i>P. Pastoris</i> BSY12MS Stammkonstruktion	4
2.1	Mikroskopische Aufnahme des <i>P. pastoris</i> BSY12MS Stamms im Phasenkontrast	6
2.2	Mikroskopische Aufnahme des <i>P. pastoris</i> BSY12MS Stamms im Dunkelfeld	6
2.3	C1 (Methanol)-Stoffwechsel von <i>P. pastoris</i>	7
4.1	Animpf-Schema der 6-well-Platte Testexpression von 3 Klonen	26
4.2	Animpf-Schema der 6-well-Platte von Klon 1	26
5.1	Plasmidkarte der bestellten Expressionskassette pMK-T_KlenTaq	41
5.2	Histidin-Auxotrophie-Nachweis des <i>P. pastoris</i> BSY12MS	42
5.3	PCR-amplifizierter Bereich des Plasmids pBSY2H4	43
5.4	Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes pBSY2H4	44
5.5	Schematische Darstellung der GG Klonierung	44
5.6	PCR-amplifizierter Bereich des Plasmids pBSY2H4_KlenTaq	45
5.7	Überprüfung der GG Klonierung mittels Check-PCR und Gelelektrophorese	45
5.8	Überprüfung von Transformanden mittels Check-PCR und Gelelektrophorese	47
5.9	Überprüfung der Plasmid-Linearisierung mittels Gelelektrophorese	49
5.10	Semilogarithmische Verfolgung der <i>P. pastoris</i> Batch-Kultur	50
5.11	Lineare Verfolgung der <i>P. pastoris</i> Batch-Kultur	51
5.12	Agarplatten BMG2 Minimalmedium und ausplattierten Transformationsansätzen nach 4 Tagen Inkubation bei RT	52
5.13	Agarplatten mit Ausstrich der 6 großen Klone	53
5.14	Agarplatte mit Ausstrich des kleinen Klons	53
5.15	Simulation PCR-Amplifikation des Klon 1 mit Primer 18/19	54
5.16	Simulation PCR-Amplifikation des <i>P. pastoris</i> BSY12MS WT mit Primer 17/18	54
5.17	Simulation PCR-Amplifikation des Klon 1 mit Primer 17/18	55
5.18	Simulation PCR-Amplifikation des Klon 1 mit Primer 17/20	55
5.19	Überprüfung der Transformanden mittels Sequenzierungs-PCR und Gelelektrophorese	56
5.20	Sequenzierung des Klon 1 (Primer 18/19)	57
5.21	Sequenzierung des Klon 1 (Primer 17/20)	58
5.22	Sequenzierung des Klon 1 (Primer 17/18)	58
5.23	Sequenzierung des <i>P. pastoris</i> WT	59
5.24	Vergleich der kultivierten KlenTaq DNA Polymerase Klon 1, 3 und 5, sowie des <i>P. pastoris</i> BSY12MS WT	60
5.25	SDS-PAGE peqGold Taq DNA Polymerase	62
5.26	SDS-PAGE Hemo KlenTaq®, emprimierte Klentaq und peqGold Taq DNA Polymerase	63
5.27	Vergleich der nicht aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase mit Elutionsfraktionen der <i>beads</i> -Aufreinigung	65

5.28	Vergleich der nicht aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase mit Elutionsfraktionen der <i>beads</i> -Aufreinigung mit und ohne Hitzebehandlung	66
5.29	Vergleich der KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer mit und ohne Glycerin, sowie mit der KlenTaq DNA Polymerase im Überstand	67
5.30	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte pBSY2H4 mit Primer 16 und 17 zur Überprüfung der Funktionalität der KlenTaq DNA Polymerase	69
A.1	Alignment der codon-optimierten und der originalen KlenTaq Gensequenzen	iii
A.2	Alignment der C-terminalen Gensequenz der KlenTaq DNA Polymerase (Primer 17)	v
A.3	Alignment der <i>P. pastoris</i> BSY12MS und <i>P. pastoris</i> BSYBG11 Gensequenzen	ix
A.4	Alignment der <i>P. pastoris</i> BSY12MS Gensequenz (Primer 83)	x
A.5	Alignment der <i>P. pastoris</i> BSY12MS Gensequenz (Primer 82)	xiii
A.6	Alignment der <i>P. pastoris</i> BSY12MS Gensequenz (Primer 82)	xvii
A.7	Alignment der linken Flanke (Primer 18)	xxii
A.8	Alignment der linken Flanke (Primer 19)	xxvii
A.9	Alignment der rechten Flanke (Primer 20)	xxxii

Tabellenverzeichnis

3.1	Geräteliste	9
3.2	Eingesetzte Chemikalien	12
3.3	Verwendete Enzyme	17
3.4	Verwendete Primer	18
3.5	Eingesetzte Lösungen und Puffer	19
3.6	Verwendete Ladepuffer und DNA-Ladder	20
3.7	Eingesetzte Nährmedien	22
3.8	Verwendete Kits	23
4.1	Zellaufzucht <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i> in Fest- bzw. Flüssigmedium	25
4.2	Reaktionsansatz Plasmid-Linearisierung	31
4.3	Temperaturprogramm der GG Klonierung	32
4.4	Zusammensetzung des Mastermixes für die GG Klonierung	32
4.5	Zusammensetzung des Mastermix für einen Ansatz á 25 µl für die Check-PCR 1	33
4.6	Zusammensetzung des Mastermix für einen Ansatz á 50 µl für die Check-PCR 2	33
4.7	Zusammensetzung des Mastermix für einen Ansatz á 50 µl für die Sequenzierungs-PCR 1	34
4.8	Zusammensetzung des Mastermix für einen Ansatz á 50 µl für die Sequenzierungs-PCR 2	34
4.9	PCR-Temperaturprogramm 1	35
4.10	PCR-Temperaturprogramm 2	35
4.11	PCR-Temperaturprogramm 3	35
5.1	Berechnung Anzahl Plasmid pBSY2H4/Zelle	43
5.2	Daten Elektroporation <i>E. coli</i>	46
5.3	OD_{600} -Messung der Hauptkultur 3 bis zu einer OD_{600} von 0,9	50
5.4	Daten Elektroporation <i>P. pastoris</i>	51
5.5	PCR-Produkte und Primer für Sequenzierung der Übergänge des <i>P. pastoris</i> Genoms mit integriertem Vektor	57
5.6	PCR-Produkte und Primer für Sequenzierung des <i>P. pastoris</i> BSY12MS und <i>P. pastoris</i> BSYBG11 Genoms	59

1 Einleitung

1.1 Expressionssysteme im Überblick

Für die rekombinante Expression von Proteinen, z. B. in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie, sowie in der Biotechnologie, sind eine Vielzahl von Expressionssystemen etabliert wie beispielsweise Bakterien, Hefen sowie tierische und pflanzliche Zellen [Lee u. a., 2012b]. Für die Auswahl des entsprechenden Expressionssystems müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, da nicht jedes System für jede Anwendung sinnvoll ist. Zum einen kann es von Bedeutung sein, ob posttranslationale Modifikationen möglich sind oder wie hoch die Ausbeute ist. Zum anderen müssen der Arbeits- und Kostenaufwand abgewogen werden [Wink, 2011]. So werden in Hefen hergestellte Proteine ebenso posttranslational modifiziert wie in Säugerzellkulturen hergestellte Proteine. Auf Säugerzellkulturen muss jedoch zurückgegriffen werden, wenn es um die Herstellung rekombinanter Proteine mit hoher Qualität und Wirksamkeit, z. B. für klinische Zwecke geht. Nachteilig an Säugerzellkulturen ist jedoch, dass sie nicht so leicht handhabbar sind, die Ausbeute geringer und der Kostenaufwand größer ist als bei Hefezellen [Morton und Potter, 2000; Wurm, 2004].

1.2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es durch *Golden Gate* Klonierung einen Expressionsvektor zu konstruieren und einen Histidin (His)-Auxotrophen *P. pastoris* Stamm durch diesen Expressionsvektor zu transformieren, um dann die KlenTaq DNA Polymerase rekombinant zu exprimieren. Die Sequenz des Proteins wurde codon-optimiert und besitzt einen N-terminalen His6-tag. Der Proteinexport erfolgte über die pre-pro Sequenzen.

Die Arbeitsschritte sind in Abb. 1.2 dargestellt.

Zunächst wurde die *Golden Gate* Klonierung [Engler u. a., 2008] durchgeführt, um einen synthetische DNA-Abschnitt eines Vektors (pMK-T_KlenTaq) mit dem *Gene of Interest* (GOI) (siehe Abb. 1.1) in den Zielvektor (pBSY2H4) umzuklonieren.

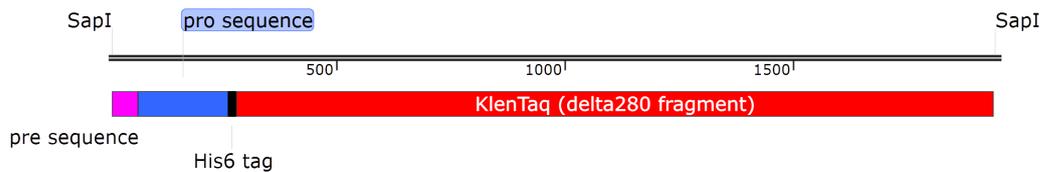


Abbildung 1.1: Simulation des bestellten Genkonstrukts

Dargestellt sind die Sequenzbereiche, die für das Signalpeptid, den His6-tag und die KlenTaq DNA Polymerase codieren. Zusätzlich sind die flankierenden *SapI* Schnittstellen dargestellt.

Der Vorteil ist hierbei, dass Restriktionsverdau und Ligation simultan stattfinden. Der so entstandene Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq erhielt durch das Ampicillin-Gen (*Amp^R*) des Zielvektors pBSY2H4 eine Ampicillin-Resistenz, über welche *E. coli* Transformanten selektiert wurden. Es folgte die Plasmid-Isolierung, sowie Charakterisierung des Expressionsvektors pBSY2H4_KlenTaq.

Um *P. pastoris* BSY12MS durch Elektroporation durch den Expressionsvektor zu transformieren, wurde der Expressionsvektor zunächst durch Restriktionsverdau mit *PmeI* linearisiert, da so die homologe Rekombination innerhalb der genomischen pAOX1-Gensequenz stattfindet [Goetz, 2019; Inan u. a., 2007]. Durch die Wahl eines bestimmten Restriktionsenzym kann bestimmt werden, an welcher Stelle das Plasmid linearisiert werden soll. Während der Transformation werden dann die beiden homologen Sequenzen mit den Gegenstücken im *P. pastoris* Genom verknüpft. In diesem Fall wurde das Plasmid pBSY2H4_KlenTaq mit dem Restriktionsenzym *PmeI* geschnitten und so das Plasmid an der 410. Base im AOX1-Promotor linearisiert. Die Selektion der *P. pastoris* Transformanten erfolgte über das *His4*-Gen. Durch die Komplementierung des His-Auxotrophen *P. pastoris* Stamms erlangten die Transformanten die Fähigkeit auf Minimalmedium ohne Histidin zu wachsen.

Die Transkription des Zielgens wurde unter Kontrolle des pAOX1 gestellt, da es sich hierbei um einen starken Promotor handelt, welcher in Abwesenheit von Glucose durch Methanol induziert werden kann [Cereghino u. a., 2002].

Der gewünschte Einbau der Gensequenz in das *P. pastoris* Genom wurde mittels PCR und Sanger-Sequenzierung molekularbiologisch bestätigt. Die so überprüften Klone wurden in einer *Deepwell*-Platte kultiviert und die Expression der KlenTaq DNA Polymerase durch Stoffwechselumstellung von Glucose auf Methanol induziert. Durch eine SDS-PAGE wurde nachgewiesen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit die KlenTaq DNA Polymerase extrazellulär exprimiert wurde. Durch molekularbiologische Charakterisierungen der KlenTaq DNA Polymerase durch Sanger-Sequenzierung,

sowie die Möglichkeit die KlenTaq DNA Polymerase durch Einfügen eines His6-tags mittels Ni-NTA *magnetic beads* aufzureinigen, lässt sich auf eine korrekte Teil-Genesequenz schließen.

Es ist jedoch am Ende nicht gelungen, durch einen funktionellen Produktnachweis der KlenTaq DNA Polymerase mittels PCR eine Polymeraseaktivität nachzuweisen.

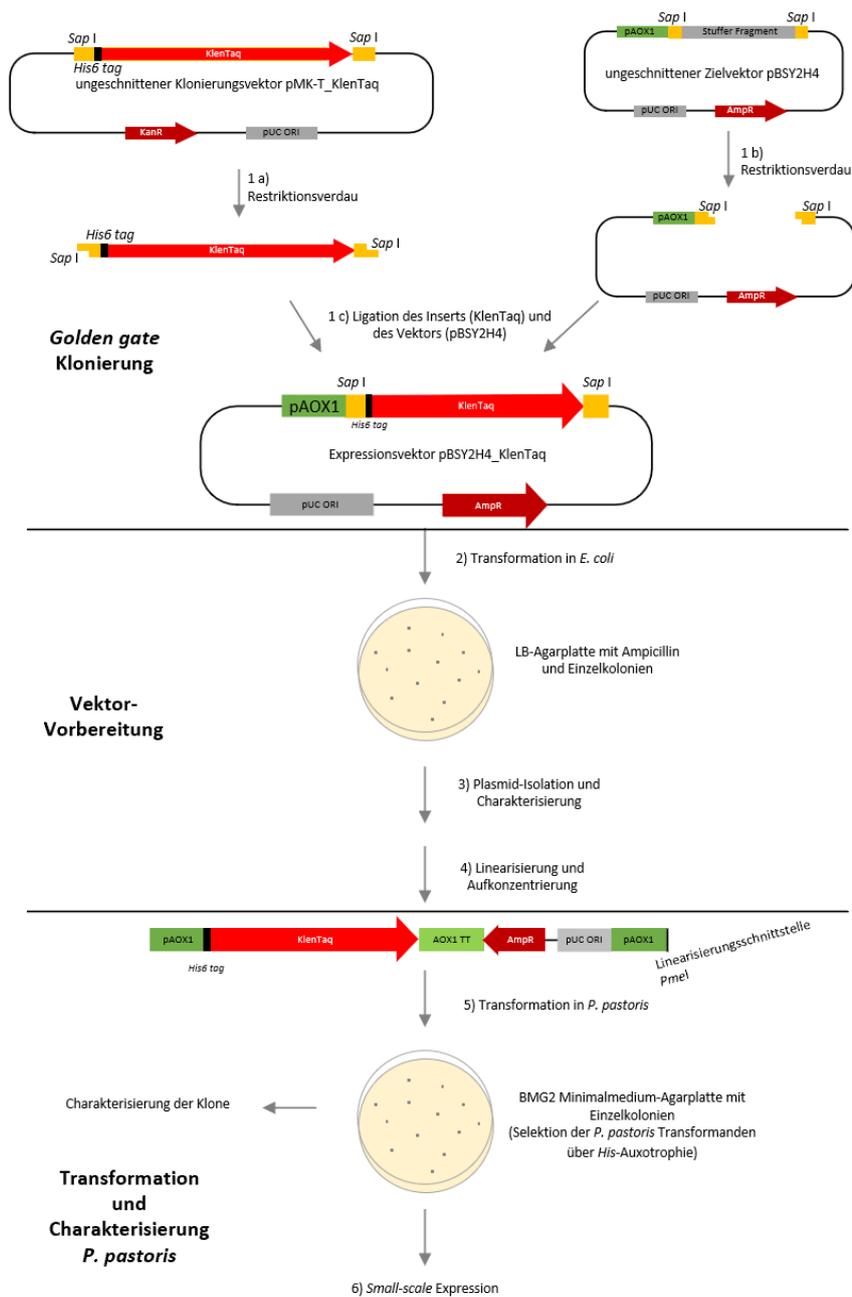


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der *P. Pastoris* BSY12MS Stammkonstruktion

1a) Durch Restriktionsverdau mit *Sap*I wurde das GOI (*KlenTaq*) aus dem Klonierungsvektor ausgeschnitten. Parallel wurde der Donationsvektor pBSY2H4 durch Restriktionsverdau mit *Sap*I geschnitten (1b)), sodass simultan die Ligation des Inserts und Vektors stattfinden konnte (1c)). 2) *E. coli* 5-alpha wurde durch den so entstandenen Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq transformiert und durch Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit Ampicillin selektiert. 3) Diese Plasmide wurden isoliert, charakterisiert und anschließend durch Restriktionsverdau mittels *Pme*I linearisiert um *P. pastoris* BSY12MS durch diesen Vektor zu transformieren (5)). 6) Anschließend folgte eine *small-scale* Expression, eine elektrophoretische Auftrennung der Zellüberstände (SDS-PAGE), sowie die Charakterisierung der Klone; **KlenTaq**: *KlenTaq*-Gensequenz, **pAOX1**: AOX1-Promotor, **AOX1-TT**: AOX1-Terminator, **pUC ORI**: ColE1 Replikationsursprung, **Kan^R**: Kanamycin-Resistenzgen, **Amp^R**: β -Lactamase.

2 Theorie

2.1 Expressionssystem *Pichia pastoris*

Die methylotrrophe Hefe *Pichia pastoris* wurde in den letzten Jahrzehnten gut erforscht und gehört heute in der Forschung zum Standardrepertoire als System zur heterologen Genexpression [Cregg u. a., 2000]. Zu den Vorteilen, *P. pastoris* als Expressionssystem zu verwenden, zählen das Vorhandensein des starken, streng regulierten Alkoholoxidase 1 (AOX1)-Promotors sowie einfache genetische Manipulation. Des Weiteren können mit *P. pastoris* Hochzelldichte-Kultivierungen im Fermenter gefahren werden, wobei kein Komplexmedium nötig ist und relevante Parameter wie pH-Wert leicht zu regulieren sind. Die Kultivierung auf Komplexmedium wird möglichst vermieden, da durch die komplexe und chemisch nicht genau bestimmte Zusammensetzung der organischen Medienkomponenten, das Wachstum zahlreicher Mikroorganismen möglich ist. Beim Minimalmedium hingegen sind die Nährstoffe chemisch definiert und nur die Nährstoffe vorhanden, die für das Wachstum des jeweiligen Mikroorganismus notwendig sind. Somit erfolgt über Minimalmedium eine Selektion des bestimmten Mikroorganismus.

Proteine können intrazellulär produziert, aber auch ins Medium sekretiert werden, wobei *P. pastoris* nur wenige eigene Proteine ins Medium sekretiert [Larsen u. a., 2013]. Der Export von rekombinanten Proteinen kann über N-terminale Signalpeptide, wie z. B. den pre-pro- α -Faktor von *Saccharomyces cerevisiae*, gesteuert werden [Barrero u. a., 2018].

Im Gegensatz zu Prokaryonten wie z. B. *E. coli*, ermöglicht *P. pastoris* als Eukaryont posttranslationale Modifikationen wie proteolytische Prozessierung, Faltung, Bildung von Disulfidbrücken, Glykolysierungen etc. und bildet keine Endotoxine [Cereghino u. a., 2002; Cregg u. a., 2000; Gonçalves u. a., 2013; Macauley-Patrick u. a., 2005]. Im Vergleich zu Säugerzellen ist bei Verwendung von *P. pastoris* als Expressionssystem die Proteinproduktivität deutlich höher und die Gefahr von Kontaminationen geringer. Des Weiteren ist der Kostenfaktor bei *P. pastoris* geringer als bei Säugerzellkulturen [Gonçalves u. a., 2013].

In Abbildung 2.1 wurde eine mikroskopische Aufnahme des in dieser Arbeit verwendeten *P. pastoris* BSY12MS Stamms im Phasenkontrast dargestellt und in Abbildung 2.2 ist eine mikroskopische Aufnahme im Dunkelfeld abgebildet.

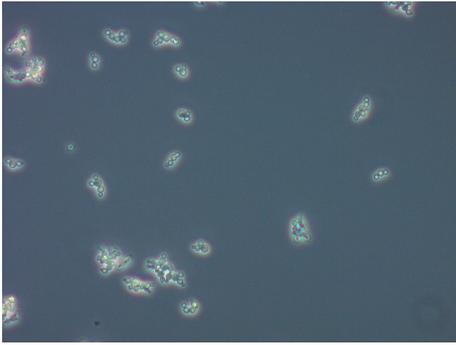


Abbildung 2.1: Mikroskopische Aufnahme des *P. pastoris* BSY12MS Stamms im Phasenkontrast.

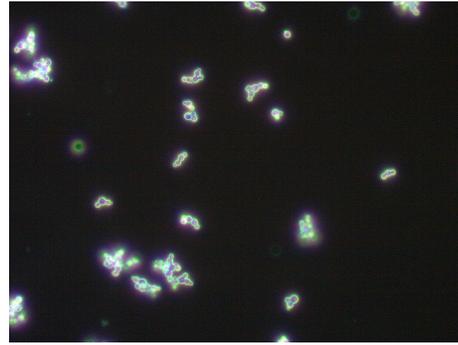


Abbildung 2.2: Mikroskopische Aufnahme des *P. pastoris* BSY12MS Stamms im Dunkel-feld.

2.2 Der Methanol-Metabolismus von *Pichia pastoris*

Die methylotrophe Hefe *P. pastoris* ist in der Lage durch den C1 (Methanol)-Stoffwechsel Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. In Abbildung 2.3 ist der zyklische Methanol-Metabolismus von *P. pastoris* schematisch dargestellt. Der Methanol-Stoffwechsel findet zum Teil im Peroxisomen statt, wobei es unter Anwesenheit von Methanol zur Proliferation der Peroxisomen kommt und in Anwesenheit von Glucose oder Glycerin als C-Quelle bilden sich die Organellen zurück. Zu Beginn des Methanol-Metabolismus kommt es zur Oxidation des Methanols zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch Alkoholoxidasen (AOX). Eine Katalase (CAT) spaltet das toxische H_2O_2 in einer Redoxreaktion zu Wasser und Sauerstoff, während das Formaldehyd in zwei Dehydrogenase Reaktionen (FLD, FDH) oxidiert oder im Zellstoffwechsel assimiliert wird.

Für die Oxidation verlässt das Formaldehyd die Peroxisomen und wandert ins Cytosol, in welchem die Dehydrogenasen lokalisiert sind. Im Cytosol wird das Formaldehyd nun über Zwischenschritte zu Kohlendioxid oxidiert, wobei NADH entsteht, welches in die Atmungskette eingebracht wird und als Energiequelle dient. Für die Assimilation im Zellstoffwechsel kondensiert das Formaldehyd mit D-Xylulose-5-phosphat (Xu_5P) zu Dihydroxyaceton (DHA) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP). DHA und GAP verlassen die Peroxisomen ins Cytosol und werden in einem zyklischen Reaktionsweg für Energiegewinnung und Biomasseaufbau genutzt [Cereghino und Cregg, 2000; Hartner und Glieder, 2006; van der Klei u. a., 2006].

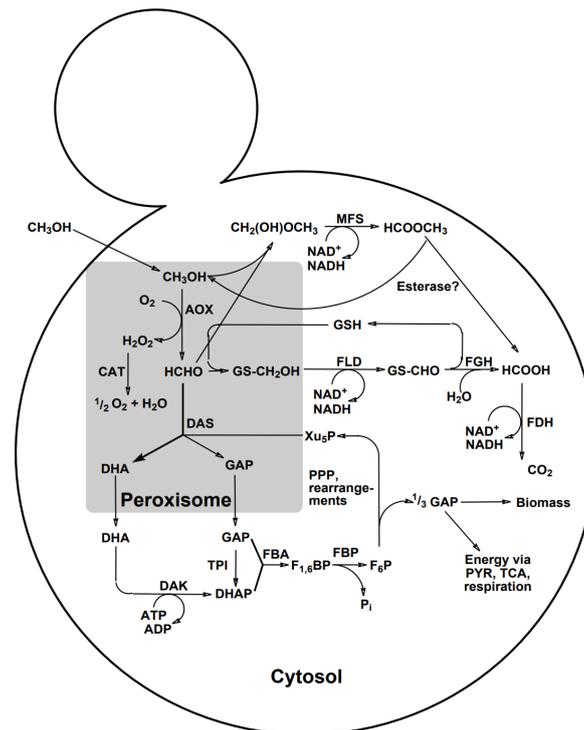


Abbildung 2.3: C1 (Methanol)-Stoffwechsel von *P. pastoris*

Schematische Darstellung des Methanol-Metabolismus mit den beteiligten Enzymen. **AOX:** Alkoholoxidase (EC 1.1.3.13), **CAT:** Katalase (EC 1.11.1.6), **FLD:** Formaldehyddehydrogenase (EC 1.2.1.1), **FGH:** S-Formylglutathionhydrolase (EC 3.1.2.12), **FDH:** Formiatdehydrogenase (EC 1.2.1.2), **DAS:** Dihydroxyacetonsynthase (EC 2.2.1.3), **TPI:** Triosephosphatisomerase (EC 5.3.1.1), **DAK:** Dihydroxyacetonkinase (EC 2.7.1.29), **FBA:** Fructose-1,6-bisphosphataldolase (EC 4.1.21.13), **FBP:** Fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11), **MFS:** Methylformiatsynthase; **DHA:** Dihydroxyaceton, **GAP:** Glycerinaldehyd-3-phosphat, **DHAP:** Dihydroxyacetonphosphat, **F_{1,6}BP:** Fructose-1,6-bisphosphat, **F₆P:** Fructose-6-phosphat, **P_i:** Phosphat, **Xu₅P:** Xylulose-5-phosphat, **GSH:** Glutathion, **PYR:** Pyruvat; **PPP:** Pentosephosphatweg, **TCA:** Tricarbonsäurezyklus [Hartner und Glieder, 2006].

2.3 AOX1 und AOX2

Methylotrophe Organismen, wie z. B. *P. pastoris*, werden häufig als Wirtszellen für die Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt. Es wird das Vorhandensein der starken, streng regulierten AOX-Promotoren (pAOX) für diese Zwecke genutzt [van der Klei u. a., 2006]. *P. pastoris* besitzt zwei Gene, die für Alkoholoxidasen codieren, AOX1 und AOX2, wobei die meiste Alkoholoxidaseaktivität auf das Produkt von AOX1 zurückgeführt werden kann. Die Regulation der beiden Promotoren scheint auf dem Prinzip der Repression, Derepression und Induktion zu beruhen, wobei die Transkription der AOX-Gene durch die Repressoren Glucose, Ethanol und Glycerin gehemmt und durch Anwesenheit von Methanol, in Abwesenheit der Repressoren,

stark induziert wird. Die alleinige Abwesenheit der Repressoren ist nicht ausreichend für die Transkription von AOX1 [Cereghino und Cregg, 2000].

2.4 KlenTaq DNA Polymerase

Bei der KlenTaq DNA Polymerase handelt es sich um das Klenow-Fragment der Taq DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Als Klenow Fragment wird das größere der beiden Proteinfragmente der DNA Polymerase I aus *E. coli* bezeichnet, die nach enzymatischer Spaltung mit Subtilisin entstehen [Allen u. a., 1989]. Übertragend wird dieser Begriff auch auf die Taq Polymerase angewendet, die N-terminal um 280 AS verkürzt wurde und im Gegensatz zur Taq DNA Polymerase keine 5'-3' Exonuklease-Aktivität besitzt [Barnes, 1995].

Ein weiterer Unterschied ist, dass die relative Mutationsrate der KlenTaq DNA Polymerase halb so groß ist, wie bei der ungekürzten Taq DNA Polymerase [Barnes, 1992].

Die Taq DNA Polymerase wird aus den extrem thermophilen Bakterien *Thermus aquaticus* gewonnen und gehört wie auch *E. coli* zur Familie A der DNA Polymerasen [Braithwaite und Ito, 1993]. Die Strukturdomänen der Taq DNA Polymerase des Klenow Fragments der DNA Polymerase I aus *E. coli* weisen starke Homologien auf und besitzen beide die katalytische Polymerasedomäne am C-terminus [Eom u. a., 1996; Kim u. a., 1995; Korolev u. a., 1995]. Die größten Unterschiede der Taq DNA Polymerase zur *E. coli* DNA Polymerase I scheinen die hohe Thermostabilität und Thermoaktivität, sowie das Fehlen der nativen 3'-5' Exonuklease-Aktivität (*proofreading*) zu sein [Lawyer u. a., 1993].

Die Taq DNA Polymerase ist durch die hohe Thermostabilität, Schnelligkeit und hohe Prozessivität sehr gut für die PCR geeignet [Drum u. a., 2014; Innis u. a., 1988]. Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Sequenz der KlenTaq DNA Polymerase besteht aus 1659 bp. Anhand eines Daten-Konverters (https://www.bioline.com/us/media/calculator/01_06.html) wurde anhand der Anzahl der Basen das Molekulargewicht der KlenTaq DNA Polymerase berechnet. Sie ist ca. 62 kDa groß.

3 Material

3.1 Geräte

In Tabelle 3.1 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte gelistet.

Tabelle 3.1: Geräteliste.

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Analysenwaage	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Germany	Kern 410
Autoklav	Systec GmbH, Linden, Germany	Systec V-150
Dampferzeuger	ZIRBUS technology GmbH, Bad Grund (Harz), Germany	Steamboy DG 18
Elektrophorese- apparatur	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	Xcell SureLock™ Mini-Cell
Elektroporator	Eppendorf AG, Hamburg, Germany	Eporator
Geldokumentation	INTAS Science Imaging GmbH, Göttingen, Germany	GelStick IMAGER
Kompaktschüttler	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Germany	KS-15
Kühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany	3 K 10
Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany	AXIO Lab. A1
Mikroskopie-Kamera	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany	Axiocam Erc 5s

3 MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Netzgerät (Elektrophorese)	Biometra GmbH, Göttingen, Germany	PS 305T XL
pH-Elektrode	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz	LE 438 pH
pH-Messgerät	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz	FiveEasy F20
Präzisionswaage	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Germany	Kern 510-63
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Germany	Entris® II
Schüttelinkubator	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Germany	AXON SI-20
Schüttelheizblock	Eppendorf AG, Hamburg, Germany	ThermoMixer F2.0
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	HERASafe KS 12
Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	Genesys 10S Vis
Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	NanoDrop 2000C
Vakuumpzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Germany	Concentrator plus
ThermoCycler	Analytik Jena AG, Jena, Germany	FlexCycler ²

3 MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Wärmeschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen, Germany	BD-115, ED-115
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Germany	Centrifuge 5418 R
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Germany	Centrifuge 5430 R

3.2 Chemikalien

In Tabelle 3.2 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien gelistet.

Tabelle 3.2: Eingesetzte Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller	Art-Nr.	Lot. Nr.
1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	6908.3	487265723
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	5210.3	207258442
Agarose	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	540-5510UB	3049010
Ammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt Germany	1.01217	A779617
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	K029.1	24570611
Bacto™Peptone	VWR International, Pennsylvania, USA	211677	8052930
D(+)-Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	X997.3	288273364
Di-Kalium- hydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	P749.1	216241854
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	4720.1	289286236
D-Sorbit ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	6213.1	517258883

3 MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller	Art-Nr.	Lot. Nr.
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt Germany	A5097	5S005739
Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	9065.3	47254233
Ethanol vergällt ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	K928.2	479290442
Ethylenglykol ROTIPURAN® ≥ 99,5 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	6881.1	349284915
Glycerin ROTIPURAN® ≥ 99,5 %, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	3783.2	276244921
Hefeextrakt, mikro-granuliert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	2904.4	29275739
YNB (ohne Aminosäuren)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	HP26.1	058267323
Imidazol	Thermo Fisher Scientific Inc., New Hampshire, USA	1747	1007002005
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt Germany	1.04936	K32747836
Kalium- dihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	3904.1	287260603

3 MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller	Art-Nr.	Lot. Nr.
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	T832.2	317261593
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt Germany	1.05833	A406433
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	CP43	K16841809
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	6773.2	33788753
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	3957.1	47253803
Natriumhydroxid Mikrogranulat	Th.Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Germany	1375	1009/12/12
Natronlauge 1,0 mol/l	Th.Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Germany	1340	19.1451310
PCR-Wasser (BioScience-Grade)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	T143.2	418276632
Pufferlösung pH 4,00 ± 0,02 (20 °C)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	A517.2	1659374
Pufferlösung pH 7,00 ± 0,02 (20 °C)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	P713.2	1657534
Roti-Blue 5x	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	A152.1	188271186
Rotiphorese® 50x TAE Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	CL86.1	027253844

3 MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller	Art-Nr.	Lot. Nr.
Rotiphorese® 10x SDS Page	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	3060.1	168270498
Roti®-Load 2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	K930.1	248272465
Salzsäure 1,0 mol/l	Th.Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Germany	850.1000	19.1501310
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt Germany	A2263	5E004009
SeeBlue® Plus2 Prestained Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	LC5925	1880481
SERVAGel™PRiME™ 10 %	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany	43264.01	V180111
Tris-Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	9090.1	207257767
Triton-X-100	Merck KGaA, Darmstadt Germany	x-100	52H0286
Tween20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany	9127.1	407263603

3.3 Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

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]
Aus diesem Stamm wurde der Donationsvektor pBSY2H4 isoliert.
- 5-alpha (NEB, USA) mit dem Genotyp: *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA* *glnV44* Θ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*
Dieser Stamm wurde für die Klonierung und Vermehrung des *high-copy* Plasmids verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Hefestämme verwendet:

P. pastoris Stamm:

- BSY12MS (bisy, Hofstätten/Raab, Österreich) mit dem Genotyp: AOX1 vom Phänotyp Mut^S
Dieser Stamm wurde für die extrazelluläre Expression des Zielproteins (KlenTaq DNA Polymerase) verwendet.
- BSYBG11 (bisy, Hofstätten/Raab, Österreich) mit dem Genotyp: AOX2 vom Phänotyp Mut^S.
Dieser Stamm wurde als Referenzstamm verwendet.

3.4 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet:

- Zielvektor: pBSY2H4 (7158 bp, Selektionsmarker: Ampicillin; bisy, Hofstätten/Raab, Österreich).
- Klonierungsvektor: pMK-T_KlenTaq (4265 bp, Selektionsmarker: Kanamycin; Thermo Fisher Scientific, USA).
- Expressionsvektor: pBSY2H4_KlenTaq (8660 bp, Selektionsmarker: Ampicillin;).

3.5 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der Tabelle 3.3 gelistet.

Tabelle 3.3: Verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Konz.	Hersteller	Art.-Nr.
<i>PmeI</i> (Restriktionsenzym)	10 U/ μ l	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany	R0560S
<i>SapI</i> (Restriktionsenzym)	10 U/ μ l	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany	R0569S

3.6 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (biomers.net GmbH) sind in der Tabelle 3.4 gelistet. Die Bezeichnung der Primer wurde nach einer laborinternen Nomenklatur vergeben. Es wurde die jeweilige Bindungsstelle, Sequenz in 5'-3'-Richtung, Anzahl der Basen sowie die Schmelztemperatur (TM) gelistet.

Tabelle 3.4: Verwendete Primer.

Bezeichnung (Bindungsstelle)	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Länge [bp]	TM [°C]
Primer 16 (pAOX1)	CGACTGGTTCCAATTGACAAGC	22	58
Primer 17 (AOX1_TT)	GCATCTCTCAGGCAAATGGC	20	59
Primer 18 (FMS1-2_pAOX1_pre-pro fwd)	TGAGTCGCAACCAACCTACC	20	59
Primer 19 (FMS1-2_pAOX1_pre-pro rev)	CACCCTCTTCCTTAGCAGCA	20	57
Primer 20 (pUC ORI_pAOX1_FDHI fwd)	CCTTTTGCTGGCCTTTTGCT	20	59
Primer 73 (BglII-Side rev)	GACTCGTGTGTTGGCCAGTA	20	58
Primer 82 (Pichia_3'-Region fwd)	CCCCAAATGGCCCCAAAACCTG	20	60
Primer 83 (Pichia_3'-Region rev)	GCGGGTATCACCATTCCCAT	20	60

3.7 Lösungen, Puffer und DNA-Ladder

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen, Puffer und DNA-Ladder sind in Tabelle 3.5 und Tabelle 3.6 gelistet.

Tabelle 3.5: Eingesetzte Lösungen und Puffer.

Name	Reagenz	Zusammensetzung
DNA-Puffer	EDTA	0,1 mM
	Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
	Triton-X-100	1%
	Tween 20	0,5%
EDS-Lösung	VE-Wasser	600 ml
	Ethylen Glycol (30 %)	100 ml
	DMSO (50 %)	100 ml
	Sorbitol (5 M)	200 ml
EtNa-Lösung	Ethanol (100 %)	600 ml
	NaOH (1 M)	200 ml
	EDTA (0,5 M)	4,5 ml
	VE-Wasser	195,5 ml
Glucose-Lösung	Glucose	500 g/l
	Autoklaviert 121 °C, 15 min	-
5x PPB	K ₂ HPO ₄	22,99 g/l
	KH ₂ PO ₄	118,13 g/l
	pH: 6,0	-
	Autoklaviert 121 °C, 15 min	-
SDS-PAGE-Färbelösung	VE-Wasser	60 ml
	Ethanol ($\geq 99,8\%$)	20 ml
	Roti [®] -Blue (5x)	20 ml
SDS-PAGE-Laufpuffer	VE-Wasser	900 ml
	Rotiphorese [®] 10x SDS-PAGE	100 ml
SDS-PAGE-Probenpuffer	Roti [®] -Load 2	500 μ l
	DTT (1 M)	10 μ l
	VE-Wasser	490 μ l
SDS-PAGE-Waschlösung	VE-Wasser	150 ml
	Ethanol ($\geq 99,8\%$)	50 ml

Tabelle 3.6: Verwendete Ladepuffer und DNA-Ladder.

Bezeichnung	Konz.	Hersteller	Art.-Nr.
10x PCR Puffer	10x	angesetzt nach ROP_LP09 Version: 02 [Schiffel, 2018e]	-
10x T4-Ligasepuffer with 10 mM ATP	10 x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany	B0202A
5x Phusion HF-Buffer	5 x	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	F518L
CutSmart® Buffer	10 x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany	B7204S
GelGreen Nucleic Acid Stain	10 000 x	Biotium, Fremont, USA	41005
Gel Loading Dye Purple	6 x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany	#B7024S
Invitrogen dNTP Mix	10 mM	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	100004893
peqGold Taq DNA Polymerase	5 U/μl	VWR International, LLC, Pennsylvania, USA	PEQL01-1050
Phusion Hot Start II	2 U/μl	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	F-549
Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder	-	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany	N0550S
Roti®-Blue quick ready-to-use	1 x	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	4829.2

3 MATERIAL

Bezeichnung	Konz.	Hersteller	Art.-Nr.
ROTI-MIX PCR 3	10 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	L785.3
SeeBlue® Plus2 Prestained Standard	-	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	LC5925
SYBER® Safe DNA Gel Stain	10 000 x	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	S33102
T4 DNA Ligase	400 U/μl	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany	M0202S

3.8 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 3.7 gelistet. Wurden die Medien in fester Form als Agarplatte verwendet, wurden 15 g/l Agar zugesetzt.

Tabelle 3.7: Eingesetzte Nährmedien.

Name	Reagenz	Zusammensetzung
<i>buffered minimal</i>	VE-Wasser	680 ml
<i>glucose</i> (BMG1); enthält 1 % Glucose	5x PPB 10x YNB Autoklaviert 121 °C, 15 min Glucose (500 g/l)	200 ml 100 ml - 20 ml
<i>buffered minimal</i>	VE-Wasser	680 ml
<i>glucose</i> (BMG2); enthält 2 % Glucose	5x PPB 10x YNB Zusatz von Glucose (500 g/l)	200 ml 100 ml 40 ml
<i>buffered minimal</i>	VE-Wasser	690 ml
<i>methanol</i> (BMM1); enthält 1 % Methanol	5x PPB 10x YNB Methanol	200 ml 100 ml 10 ml
<i>buffered minimal</i>	VE-Wasser	650 ml
<i>methanol</i> (BMM5); enthält 5 % Methanol	5x PPB 10x YNB Methanol	200 ml 100 ml 50 ml
Hefe-Minimal-Medium (ohne Aminosäuren)	YNB sterilfiltriert	10x (65 g/l) -
LB-Lennox-Medium	Hefeextrakt Pepton NaCl VE-Wasser pH: 7,0 Autoklaviert 121 °C, 15 min	5 g/l 10 g/l 5 g/l 800 ml - -

Name	Reagenz	Zusammensetzung
YPD-Medium	Hefeextrakt	10 g/l
	Pepton	20 g/l
	VE-Wasser	800 ml
	pH: 6,5	-
	Autoklaviert 121 °C, 15 min	-
	Zusatz von Glucose (500 g/l)	40 ml/l

3.9 Kits

In Tabelle 3.8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits gelistet.

Tabelle 3.8: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller	Art-Nr.
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany	27104
Microspin Cycle Pure Kit	VWR International, LLC, Pennsylvania, USA	12-6293-02
Monarch® Plasmid Miniprep Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany	T1010G
Roti®-Spin MIDI-30, 30 MWCO (kD), rot	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	CL18.1

4 Methoden

4.1 Zellaufzucht

4.1.1 Zellaufzucht in Fest- bzw. Flüssigmedium

Um Einzelkolonien der jeweiligen Stämme zu erhalten, wurden unter einer Sicherheitswerkbank Agarplatten gegossen. Die Stämme wurden mittels 3-Ösen-Ausstrich ausplattiert oder ein definiertes Volumina einer Flüssigkultur auf die Platte gegeben und mit einem Drigalskispatel ausgestrichen. Die Agarplatten wurden bei der in Tabelle 4.1 angegebenen Temperatur für die jeweilige Zeit im Brutschrank inkubiert. Für die Zellaufzucht in Flüssigmedium wurde ein definiertes Volumen des jeweiligen Mediums mit einer Einzelkolonie angeimpft und für die in Tabelle 4.1 angegebenen Bedingungen im Schüttelinkubator inkubiert.

Tabelle 4.1: Zellaufzucht *E. coli* und *P. pastoris* in Fest- bzw. Flüssigmedium.

Stamm	Medium	Bedingungen	Dauer
<i>E. coli</i> JM109	LB-Lennox	37 °C, 200 rpm	Über Nacht
<i>E. coli</i> JM109 pBSY2H4	LB-Lennox mit 100 µg/ml Ampicillin	37 °C, 200 rpm	Über Nacht
<i>E. coli</i> 5-alpha	LB-Lennox	37 °C, 200 rpm	Über Nacht
<i>E. coli</i> 5-alpha pBSY2H4	LB-Lennox mit 100 µg/ml Ampicillin	37 °C, 200 rpm	Über Nacht
<i>E. coli</i> 5-alpha GG-Ansatz	LB-Lennox mit 100 µg/ml Ampicillin	37 °C, 200 rpm	Über Nacht
<i>E. coli</i> 5-alpha pMK-T_KlenTaq	LB-Lennox mit 50 µg/ml Kanamycin	37 °C, 200 rpm	Über Nacht
<i>E. coli</i> 5-alpha pMK-T_KlenTaq	LB-Lennox mit 15 µg/ml Kanamycin	37 °C, 200 rpm	Über Nacht
<i>E. coli</i> 5-alpha pBSY2H4_KlenTaq	LB-Lennox mit 100 µg/ml Ampicillin	37 °C, 200 rpm	Über Nacht
<i>P. pastoris</i> BSY12MS	YPD mit 20 g/l Glucose	30 °C, 200 rpm	Über Nacht
<i>P. pastoris</i> BSY12MS	BMG2-Hefe-Minimalmedium	30 °C	Über 2 Nächte
<i>P. pastoris</i> BSY12MS	BMG2-Hefe-Minimalmedium mit 40 µg/ml His	30 °C	Über 2 Nächte

4.1.2 *Small-scale* Expression in 6-well-Zellkulturplatten

Die *small-scale* Fermentation zur Expression der KlenTaq DNA Polymerase wurde nach einer laborinternen Methode [Schiffel, 2018f] durchgeführt und lief über ca. 7 Tage. Diese *small-scale* Expression wurde zwei Mal durchgeführt (siehe Abb. 4.1 und Abb. 4.2).

Zunächst wurden 2,5 ml BMG1-Medium in 4 *wells* der 6-well-Platte gegeben. Anschließend wurden mit einem Zahnstocher Einzelkolonien der jeweiligen Klone, sowie

des Wildtyps (WT) gepickt und die entsprechenden *wells* angeimpft.

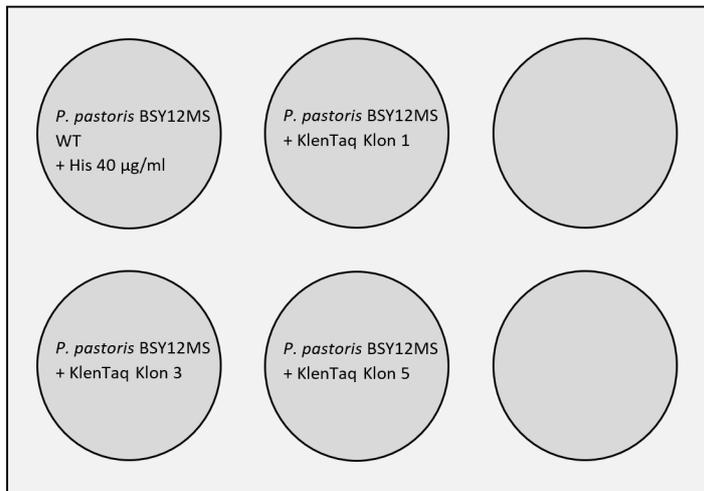


Abbildung 4.1: Animpf-Schema der 6-*well*-Platte Testexpression von 3 Klonen.

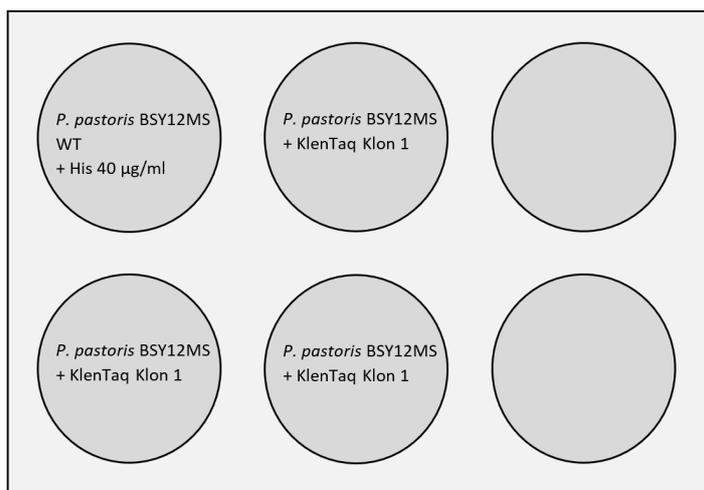


Abbildung 4.2: Animpf-Schema der 6-*well*-Platte von Klon 1.

Die Platten wurden mit einer gasdurchlässigen Folie verschlossen und der Deckel der Platte leicht aufgesetzt. Die Inkubation der Platten erfolgte über 70 h bei Raumtemperatur (RT) auf dem Horizontalschüttler (100 rpm). Für die Induktion, d. h. die Stoffwechsellumstellung von Glucose auf Methanol, wurde mit einer Kanüle für jedes *well* ein Loch in die Folie gestochen und 2,5 ml BMM1-Medium in jedes *well* gegeben, der Deckel aufgesetzt und die Platte für ca. 7 h bei RT auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Anschließend wurden zur Aufrechterhaltung des Methanolstoffwechsels 0,5 ml BMM5-Medium in jedes *well* gegeben und wieder über Nacht bei RT auf dem

Horizontalschüttler inkubiert. Die Zugabe von 0,5 ml BMM5-Medium wurde bis zur Zellernte nach ca. 7 Tagen täglich wiederholt.

4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

4.2.1 Absorptionsmessung zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm die Extinktion mit einem Spektralphotometer (NanoDrop) gemessen, da bei dieser Wellenlänge Nukleinsäuren absorbieren. Die Messung der Absorption bei 230 nm dient der Detektion organischer Substanzen und bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren Proteine und Phenole [Olson und Morrow, 2012]. Aus den Verhältnissen der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm können Aussagen über die Reinheit der DNA-Probe getroffen werden. Als Richtwerte für eine reine DNA-Probe gilt ein Verhältnis $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$ sowie $A_{260}/A_{230} = 1,8 - 2,0$. Bei einem geringeren Wert liegen Verunreinigungen vor [Olson und Morrow, 2012].

4.2.2 Bestimmung der optischen Dichte

Um die Zelldichte der *E. coli* bzw. *P. pastoris* Zellen bestimmen zu können, wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Dazu wurde 1 ml Suspension in eine Halbmikro-Küvette pipettiert und die Extinktion im Photometer gemessen.

4.3 Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation

4.3.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*

Die Herstellung elektrokompenter *E. coli* erfolgte nach einer laborinternen Methode [Schiffel, 2018c]. Aus einer Einzelkolonie des *E. coli* 5-alpha wird eine Übernacht-Flüssigkultur hergestellt (siehe Abschnitt 4.1.1). In ein 2,0 ml Reaktionsgefäß wurden 1,4 ml LB-Lennox-Medium gegeben und mit 200 µl der Vorkultur angeimpft. Die Vorkultur hat sich in der exponentiellen Phase befunden. Die Zellsuspension wurde bei 37 °C und 700 rpm für ca. 2 h im Schüttelinkubator inkubiert bis deutliche Schlieren beim Invertieren des Reaktionsgefäßes sichtbar waren und anschließend in einer Kühlzentrifuge für eine Minute bei 4 °C und 2200 xg zentrifugiert. Die folgenden Waschschriffe wurden auf Eis mit auf 4 °C gekühlter Glycerinlösung (10 %

w/w) durchgeführt. Zunächst wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet in 500 µl Glycerinlösung resuspendiert. Zwei dieser Zellsuspensionen wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt, um die Zellkonzentration zu erhöhen und anschließend bei 4 °C und 2200 xg für 3 min zentrifugiert. Ein weiteres Mal wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 1 ml Glycerinlösung resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4 °C und 2200 xg für 3 min wurde der Überstand bis auf ca. 100 µl abpipettiert und das Zellpellet anschließend resuspendiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden bis zur Transformation, bei Kurzzeitlagerung auf Eis, für eine Langzeitlagerung bei -80 °C gelagert.

4.3.2 Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris*

Die Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris* erfolgte nach einer laborinternen Methode [Schiffel, 2018d]. Aus je einer Einzelkolonie des *P. pastoris* BSY12MS wurden zwei Übernacht-Flüssigkulturen à 10 ml YPD-Medium in 100 ml Schikanekolben hergestellt (siehe Abschnitt 4.1.1). Am Folgetag wurde die optische Dichte gemessen und auf Grund von zu geringem Wachstum die beiden Vorkulturen vereint (siehe Abschnitt 5.8.1). Anschließend wurden aus der Vorkultur je 3 Hauptkulturen à 50 ml angesetzt, indem 44 ml YPD-Medium + 20 g/l Glucose mit 6 ml Vorkultur angeimpft wurden. Es wurde je die Start- OD_{600} gemessen und die Schikanekolben bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600} von ca. 0,9 inkubiert. Zwei der Schikanekolben blieben dabei steril, einer diente als Probenahme-Kolben. Die folgenden Schritte wurden auf Eis und in einer, auf 4 °C temperierten, Kühlzentrifuge durchgeführt. Die beiden sterilen Schikanekolben wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend zu einem vereinigt. Anschließend wurden je 25 ml der Kultur in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und diese für 5 min bei 4 °C und 5000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 25 ml EDS-Lösung resuspendiert. Es wurde ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet erneut in 25 ml EDS-Lösung gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Zellpellet in 1 ml EDS-Lösung resuspendiert und die nun elektrokompetenten Zellen vereint und in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu 100 µl aliquotiert.

4.3.3 Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Die Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde nach einer laborinternen Methode [Schiffel, 2018h] durchgeführt. Die Plasmide wurden zu den elektrokompetenten *E. coli* Zellen gegeben und anschließend die Zellsuspension in die gekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Spalt überführt. Es wurde mit einer Spannung von

1700 V, einer Kapazität von 10 μF und einem Widerstand von 600 Ω elektroporiert. Direkt im Anschluss wurde die Elektroporationsküvette auf Eis gestellt und 1 ml gekühltes LB-Lennox-Medium in die Elektroporationsküvette gegeben und durch Resuspendieren gemischt. Anschließend wurden die transformierten Zellen in das ursprüngliche Reaktionsgefäß überführt und zur Regeneration und Expression der Resistenzgene für ca. 2 h bei 37 °C und 700 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde auf selektiven Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.3.4 Transformation elektrokompetenter *P. pastoris*

Die Transformation von elektrokompetenten *P. pastoris* Zellen wurde nach einer laborinternen Methode [Schiffel, 2018i] durchgeführt. Die Transformations-Templates wurden zu je einem Aliquot (100 μl) der elektrokompetenten *P. pastoris* Zellen gegeben und anschließend die Zellsuspension in die gekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Spalt überführt.

Die Plasmide wurden zu den elektrokompetenten *P. pastoris* Zellen gegeben und anschließend die Zellsuspension in die gekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Spalt überführt. Es wurde mit einer Spannung von 2500 V, einer Kapazität von 10 μF und einem Widerstand von 600 Ω elektroporiert. Direkt im Anschluss wurde die Elektroporationsküvette auf Eis gestellt und 1 ml gekühltes YPD-Medium in die Elektroporationsküvette gegeben und durch Resuspendieren gemischt. Anschließend wurden die transformierten Zellen in das ursprüngliche Reaktionsgefäß überführt und zur Regeneration und Expression des komplementierten *His4*-Gens für ca. 2 h bei 30 °C und 700 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Der Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq besitzt den ARG4-Promotor, wodurch das komplementierte *His4*-Gen gebildet wird und die transformierten Zellen die Fähigkeit erlangen auf Minimalmedium ohne Histidin zu wachsen. Da die Selektion der transformierten Zellen auf BMG2-Hefe-Minimalmedium erfolgte, musste die Zellsuspension nach der Regeneration zunächst zweimal mit 9 g/l NaCl-Lösung (Saline) gewaschen werden, da sie in YPD-Medium resuspendiert wurde, welches Histidin enthält. So sollte sichergestellt werden, dass nur die Zellen wachsen können, die den linearisierten Expressionsvektor im Genom integriert haben. Hierfür wurden die transformierten Zellen bei 5000 xg für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Saline resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt und anschließend 100 μl der Zellsuspension auf BMG2-Hefe-Minimalmedium-Agarplatten ausplattiert. Die Reaktionsgefäße mit den restlichen transformierten Zellen wurden für 1 min bei 2200 xg zentrifugiert und der Überstandes bis auf ca. 100 μl verworfen.

Das Zellpellet wurde in dem verbleibendem Medium resuspendiert und ebenfalls auf Minimalmedium ausplattiert. Die Agarplatten wurden über vier Tage bei RT im Brutschrank inkubiert.

4.4 DNA-Isolierung

4.4.1 Plasmidisolaton aus *E. coli*

Die Plasmidisolaton aus *E. coli* erfolgte mit einem Kit von QIAGEN oder einem von NEB. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

4.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus *P. pastoris*

Die Isolierung der genomischen DNA (gDNA) aus *P. pastoris* erfolgte nach EtNa-Protokoll, wobei „Et“ für Ethanol und „Na“ für Natriumhydroxid steht [Vingataramin und Frost, 2015]. Es wurden zunächst Übernacht-Flüssigkulturen von drei rekombinanten *P. pastoris* Klonen sowie des WT erstellt. Hierfür wurden je 10 ml YPD-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Von diesen vier Übernachtskulturen wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen und die Kulturen anschließend mit Saline so verdünnt, dass jede Verdünnung die gleiche OD_{600} hatte. Von diesen Verdünnungen wurden je 540 μ l in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 13 000 xg zentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend in je 1 ml Saline resuspendiert und 100 μ l in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Von der EtNa-Lösung wurden 455 μ l zugegeben, gemischt und für 10 min bei 80 °C im Schüttelheizblock inkubiert. Nachfolgend wurde die Suspension für 10 min bei 13 000 xg zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 100 μ l DNA-Puffer resuspendiert.

4.5 DNA-Linearisierung

Die Linearisierung des Expressionsvektors pBSY2H4_KlenTaq erfolgte mit dem Restriktionsenzym *PmeI* (NEB) nach Herstellerangaben. Ein entsprechender Restriktionsansatz inst in Tab. 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Reaktionsansatz Plasmid-Linearisierung.

Reagenz	Konzentration	Volumen [μl]	Finale Konzentration
Restriktionsenzym <i>PmeI</i>	10 U/ μl	3	30 U/Reaktion
Puffer	10 x	15	1 x
Plasmid (pBS2H4_KlenTaq)	157,42 ng/ μl	120	18,89 μg /Reaktion
ddH ₂ O	-	12	-

4.6 DNA-Fällung

Die Aufkonzentrierung der DNA durch Fällung erfolgte, indem 150 μl des Reaktionsansatzes nach der DNA-Linearisierung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 μl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) sowie 375 μl Ethanol ($\geq 99\%$) zugegeben wurden. Der Ansatz wurde durch *Vortexen* gemischt und für ca. 2 Stunden bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C und 13 000 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Ethanol (70 %, -20°C) gewaschen. Durch eine weitere Zentrifugation (15 min, 4°C , 13 000 xg) wurden die Zellen erneut pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet zunächst für 15 min bei RT, dann für 10 min bei 45°C in der SpeedVac getrocknet und abschließend in 20 μl ddH₂O gelöst.

4.7 *Golden Gate* Klonierung

Ein Vorteil der GG Klonierung ist, dass die doppelsträngige DNA durch Typ-II-Restriktionsenzyme außerhalb ihrer Erkennungssequenz geschnitten wird. So können der Restriktionsenzymverdau und die Ligation zeitgleich ablaufen, da die Erkennungssequenzen nach der Ligation nicht mehr vorhanden sind und somit ein wiederholtes Schneiden durch das Restriktionsenzym umgangen wird. In dieser Arbeit wurde nach einer laborinternen Methode gearbeitet [Schiffel, 2018b] und das Restriktionsenzym *SapI* für die GG Klonierung verwendet. Der Reaktionsansatz (Mastermix) wurde, wie in Tab. 4.4 gelistet, in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und nach dem in Tab. 4.3 gelisteten Temperatur-Programm im Thermocycler inkubiert.

Tabelle 4.3: Temperaturprogramm der GG Klonierung.

Zeit	Temperatur [°C]
Über Nacht	37
20 min	60
Pause	4

Tabelle 4.4: Zusammensetzung des Mastermixes für die GG Klonierung

Bei dem Klonierungsvektor mit GOI handelt es sich um Plasmid pMK-T_KlenTaq und bei dem Donationsvektor um Plasmid pBSY2H4.

Komponente	Menge [μ l]
H ₂ O	11
Klonierungsvektor mit GOI (90 ng/ μ l)	1
Donationsvektor (40 ng/ μ l)	4
10x T4-Ligasepuffer	2
Restriktionsenzym (<i>SapI</i>)	1
T4-Ligase (400 U)	1
Gesamtvolumen	20

4.8 Check PCR

Die PCR wurde nach der laborinternen PCR-Methode [Schiffel, 2018e] zur Amplifikation von ausgewählten Bereichen chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA durchgeführt.

Die peqGold Taq DNA Polymerase von PeqLab/VWR, welche keine 3'-5'-Exonucleaseaktivität (*proofreading*) aufweist, wurde nach Herstellerangaben genutzt, wenn die *proofreading*-Funktion nicht im Fokus lag, sondern spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen werden sollten, deren Produktgröße interessant war. Lag die *proofreading*-Funktion im Fokus, wurde die Phusion Hot Start II DNA Polymerase nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific) genutzt.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der Mastermixe exemplarisch aufgeführt.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung des Mastermix für einen Ansatz á 25 µl für die Check-PCR 1

Es wurden 5 Klone sowie der GG-Ansatz vor der Klonierung getestet. Plasmid pBSY2H4 diente bei der Überprüfung der GG Klonierung als Positiv-Kontrolle (PK), H₂O immer als Negativ-Kontrolle (NK). Von allen Proben wurden 5 µl als Template eingesetzt mit Ausnahme des GG-Ansatzes, hier wurden 1 µl Template + 4 µl H₂O eingesetzt.

Komponente	Konzentration	Menge [µl]
PCR-Wasser	-	16,00
PCR-Puffer (10x)	1x (2,0 mM MgCl ₂)	2,50
dNTPs (je 10 mM)	0,2 mM	0,50
Primermix (Primer 16/17) (je 25 µM)	0,5 mM	0,50
peqGold Taq DNA Polymerase (1,25 U/µl)	0,025 U/µl	0,50
Template	-	5,00

Der Mastermix wurde für die benötigte Anzahl an Ansätzen hergestellt und je 20 µl in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Erst dann wurde das jeweilige Template zupipettiert, die PCR-Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Temperaturprogramm gestartet (siehe Tab. 4.9).

Tabelle 4.6: Zusammensetzung des Mastermix für einen Ansatz á 50 µl für die Check-PCR 2

Als Polymerase wurden die exprimierte KlenTaq DNA Polymerase, sowie die gekaufte Hemo[®] KlenTaq DNA Polymerase eingesetzt. Es wurden 10 µl des Plasmids pBSY2H4 bzw. H₂O als Templates eingesetzt. Plasmid pBSY2H4 diente bei der Überprüfung der KlenTaq DNA Polymerase als Positiv-Kontrolle (PK), H₂O als Negativ-Kontrolle (NK).

Komponente	Konzentration	Menge [µl]
PCR-Wasser	-	7,00
<i>Hemo KlenTaq Reaction Buffer</i> (5x)	1x	5,00
dNTPs (je 10 mM)	0,2 mM	0,50
Primermix (Primer 16/17) (je 25 µM)	0,5 mM	0,50
Polymerase	unbekannt	2,00
Template	-	10,00

Der jeweilige Mastermix wurde für die benötigte Anzahl an Ansätzen hergestellt, die PCR-Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Temperaturprogramm gestartet (siehe Tab. 4.11).

Tabelle 4.7: Zusammensetzung des Mastermix für einen Ansatz á 50 µl für die Sequenzierungs-PCR 1

Es wurden der *P. pastoris* BSY12MS WT, Klon 1, 3 und 5 getestet. H₂O diente als Negativkontrolle. Von den Proben wurden 5 µl als Template eingesetzt.

Komponente	Konzentration	Menge [µl]
PCR-Wasser	-	32,50
<i>HF-Buffer</i> (5x)	1x (1,5 mM MgCl ₂)	10,00
dNTPs (je 10 mM)	0,2 mM	1,00
Primermix (je 25 µM)	0,5 mM	1,00
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µl)	0,02 U/µl	0,50
Template	-	5,00

Es wurden die Primermixe 17/18, 17/20 und 18/19 verwendet.

Der jeweilige Mastermix wurde für die benötigte Anzahl an Ansätzen hergestellt und je 45 µl in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Erst dann wurde das jeweilige Template zupipettiert, die PCR-Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Temperaturprogramm gestartet (siehe Tab. 4.10).

Tabelle 4.8: Zusammensetzung des Mastermix für einen Ansatz á 50 µl für die Sequenzierungs-PCR 2

Es wurden der *P. pastoris* BSY12MS WT, sowie der *P. pastoris* BSYBG11 WT getestet. H₂O diente als Negativ-Kontrolle. Von den Proben wurden 5 µl als Template eingesetzt.

Komponente	Konzentration	Menge [µl]
PCR-Wasser	-	32,50
<i>HF-Buffer</i> (5x)	1x (1,5 mM MgCl ₂)	10,00
dNTPs (je 10 mM)	0,2 mM	1,00
Primermix (je 25 µM)	0,5 mM	1,00
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µl)	0,02 U/µl	0,50
Template	-	5,00

Es wurden die Primermixe 16/73, 16/83,17/18 und 17/82 eingesetzt. Der jeweilige Mastermix wurde für die benötigte Anzahl an Ansätzen hergestellt und je 45 µl in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Erst dann wurde das jeweilige Template zupipettiert, die PCR-Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Temperaturprogramm gestartet (siehe Tab. 4.10).

Tabelle 4.9: PCR-Temperaturprogramm 1.

Temperatur	Zeit [mm:ss]	Zyklen
98 °C	00:30	
98 °C	00:10	
60 °C	00:15	30 x
72 °C	01:10	
72 °C	05:00	
4 °C	Pause	

Tabelle 4.10: PCR-Temperaturprogramm 2.

Temperatur	Zeit [mm:ss]	Zyklen
98 °C	00:30	
98 °C	00:10	
60 °C	00:15	30 x
72 °C	00:45	
72 °C	05:00	
4 °C	Pause	

Tabelle 4.11: PCR-Temperaturprogramm 3.

Temperatur	Zeit [mm:ss]	Zyklen
95 °C	03:00	
95 °C	00:20	
60 °C	00:30	35 x
68 °C	01:18	
68 °C	10:00	
4 °C	Pause	

4.9 Aufreinigung und Pufferwechsel

4.9.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels peqGOLD Microspin Cycle Pure Kit (VWR) nach Herstellerangaben.

4.9.2 Aufreinigung der KlenTaq DNA Polymerase mittels Ni-NTA *magnetic beads*

Die Nickel-Affinitätschromatographie nutzt die Tatsache aus, dass Proteinmotive mit mehreren Histidin-Resten hintereinander (His6-tag) an Materialien mit Nickel-Chelaten binden. Das Zielprotein (KlenTaq) verfügt über einen N-terminalen His-tag und wurde mittels Ni-NTA *magnetic beads* (SERVA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die SERVA Ni-NTA *magnetic beads* liegen als Suspension von 5% *magnetic beads* in 20% Ethanol vor, es wurden 50 µl Suspension ($\cong 2,5 \mu\text{l beads}$) eingesetzt.

4.9.3 Pufferwechsel von Proteinlösungen

Die Umpufferung von Proteinen erfolgte mittels Roti®-Spin MIDI-30 (Carl Roth) nach Herstellerangaben. Die 30 steht für ein Molekulargewicht-Cut-off (MWCO) der Membran von 30 kDa.

4.10 Ultraschallaufschluss

Der Zellaufschluss der *P. pastoris* Zellen erfolgte mittels Ultraschall-Desintegrator mit einem Cycle von 0,4, einer Amplitude von 50% und einer Einwirkzeit von 1 min. Die Parameter müssen je nach Mikroorganismus empirisch ermittelt werden, wobei bei dieser Arbeit auf laborinterne Erfahrungen [Goetz, 2019] zurückgegriffen werden konnte. Das Prinzip des Zellaufschlusses durch Ultraschall beruht auf Scherkräften, die durch Implosion von Kavitationsblasen entstehen [Doulah, 1977].

4.11 Gelelektrophoresen

4.11.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments hängt von der Größe des Moleküls ab. Nukleinsäuren sind negativ geladen und die Ladung ist proportional zur Größe des Moleküls, sodass sich ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis ergibt. Die DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld durch die Poren

des Gels von der Kathode zur Anode, wobei die Geschwindigkeit umgekehrt proportional zur Größe der Fragmente ist. Durch die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität werden die DNA-Fragmente nach ihrer Basenpaarlänge aufgetrennt und durch das Mitlaufen lassen eines Größenstandards können die aufgetrennten DNA-Fragmente der Größe nach zugeordnet werden [Lee u. a., 2012a].

In dieser Arbeit wurde nach einer laborinternen Methode [Schiffel, 2018a] gearbeitet und Agarosegele mit einer Konzentration zwischen 0,8 % und 2 % verwendet. Die Agarose-Konzentration richtet sich nach der Größe der DNA-Fragmente. Je kleiner die Fragmente sind, desto kleiner müssen die Poren sein, also umso höher die Agarosekonzentration. Die benötigte Menge an Agarose wurde in 1x TAE-Puffer gelöst und der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Safe (0,1 µl/ml) zugegeben. Nach vollständiger Auspolymerisierung wurde das Gel mit den Proben sowie Größenstandards (5 µl) beladen. Die Proben wurden hierfür zunächst mit einem 6x Ladepuffer (1 µl auf 5 µl Probe) versetzt um die Dichte zu erhöhen damit die Probe in die Tasche sinkt. Durch Anlegen einer Spannung von 80 V-120 V wurde die Gelelektrophorese gestartet, wobei sich die Laufzeit nach der Länge der Laufstrecke, Fragmentgröße sowie Spannung richtet. Die Dokumentation des Agarosegels erfolgte mittels UV Transilluminator (GelStick IMAGER, Intas).

4.11.2 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird angewandt um Makromoleküle entsprechend ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld zu trennen. Die Moleküle wandern in einer Gelmatrix (Polyacrylamid), durch Anlegen einer Spannung, im elektrischen Feld durch die Poren des Gels von der Kathode zur Anode. Die elektrische Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen hängt von drei wesentlichen Faktoren ab: Zum einen hat die Konformation Einfluss auf das Wanderungsverhalten, weshalb die Proben vor Beladung der SDS-PAGE mit dem reduzierenden Reagenz DTT versetzt werden. DTT reduziert die für die Proteinfaltung verantwortlichen Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, sodass die Proteine in ihrer Primärstruktur vorliegen und die Konformation keinen Einfluss mehr auf die Wanderungsgeschwindigkeit hat. Des Weiteren hat die Gesamt-Nettoladung des Moleküls Einfluss auf die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit. Durch Zugabe des Detergenz SDS hat die Ladung keinen Effekt mehr auf die Trennung der Proteine, da sich SDS an die Oberfläche des linearen Proteins anlagern kann und somit die Proteine eine negative Gesamt-Nettoladung proportional zu ihrem Molekulargewicht erhalten. Die Proteine werden nun der Größe nach getrennt, wobei kleine schneller durch die Matrix wandern als große Moleküle [Dechert, 2012].

In dieser Arbeit wurde nach einer laborinternen Arbeitsanweisung [Schiffel, 2018g] gearbeitet. Der Probenpuffer setzte sich aus 5 Teilen Roti-Load[®] 2, 0,1 Teilen DTT (1 M), sowie 4,9 Teilen ddH₂O zusammen. Es wurden zunächst Probe und Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Es folgte eine weitere Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugation für 30 sec bei 13 000 rpm. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgel (SERVAGel[™], 10 %, 10 Taschen) in einer vertikalen Elektrophoresekammer. Als Molekulargewichtsmarker wurden 5 µl Seebule Plus 2 PreStrained Proteinstandard aufgetragen und das Ladevolumen der vorbereiteten Proben betrug 20 µl. Der Elektrophoreselauf wurde bei 250 V für 40 min durchgeführt. Anschließend an den Elektrophoreselauf wurde das Gel gefärbt und entfärbt. Dies wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Bei der Variante 1 wurde das Gel in einer Mikrowellenbox vollständig mit ddH₂O bedeckt und 1 min bei voller Leistung in der Mikrowelle inkubiert. Anschließend wurde unter leichtem Schwenken auf dem Horizontalschüttler für 1 min inkubiert und das ddH₂O gewechselt um den Waschvorgang zweimal zu wiederholen. Nach der dritten Wiederholung wurde das ddH₂O abgossen und die Färbelösung (Simply Blue safe Stain) zum Färben des Gels in die Box gegeben und für 45 sec bei voller Leistung in die Mikrowelle gestellt. Unter leichtem Schwenken wurde das Gel auf dem Horizontalschüttler inkubiert, bis auf dem Gel Banden zu erkennen waren. Im Anschluss wurde die Färbelösung abgossen und das SDS-Polyacrylamidgel mehrere Male in ddH₂O gespült um den größten Teil der Färbelösung zu entfernen. Nachdem das Gel in frischem ddH₂O für 1 min bei voller Leistung in der Mikrowelle inkubiert wurde, wurde es unter leichtem Schwenken auf dem Horizontalschüttler inkubiert bis der Hintergrund vollständig entfärbt und die Banden gut sichtbar waren. Bei der Variante 2 wurde das Gel in der Färbelösung (Roti-Blue quick oder Coomassie-blue) über Nacht gefärbt und mit 20 % Ethanol entfärbt.

Die Dokumentation der SDS-PAGE erfolgte mittels Gel Doc[™] EZ Gel Documentation System und der Software „Image lab“.

4.12 Sequenzierung der Transformanden

Die Sequenzierung der DNA Fragmente wurde durch die Firma Eurofins Genomics durchgeführt.

4.13 Analyse, Visualisierung und Auswertung der DNA-Sequenzen und Plasmidkarten

Die Analyse, Visualisierung und Auswertung der DNA-Sequenzen und Plasmidkarten erfolgte anhand der Software SnapGene.

5 Ergebnisse

5.1 Planung der Expressionskassette

Das Plasmid pMK-T_KlenTaq wurde von Herrn Prof. Dr. Noll und Herrn Schiffel designed und bei der Firma Thermo Fisher Scientific, USA bestellt. Die Plasmidkarte ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

Die pre-pro Sequenz dient nach der Expression zur Sekretion des Zielproteins (KlenTaq) in das Medium. Die nachfolgende Sequenz, welche für den His6-tag sowie die KlenTaq DNA Polymerase codiert, wurde Codon-optimiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Basentriplets so gewählt wurden, dass sie häufiger für die Translation vorliegen, keine *SapI* Schnittstellen im GOI vorhanden sind, aber die Aminosäure-Sequenz trotzdem unverändert bleibt.

Die KlenTaq DNA Polymerase wurde so designed, dass sie den His-tag am N-terminus trägt, da dieser eine räumlich zugänglichere Position besitzt und somit die Bindung des His-tags an die Ni-NTA *magnetic beads* zur Aufreinigung erleichtert wird. Die KlenTaq DNA Polymerase trägt den His-tag nicht am C-terminus, da sich dort die katalytische Polymerasedomäne befindet und ein His-tag sich dort negativ auf die Enzymaktivität auswirken könnte [Kim u. a., 1995; Matthies, 2003; Xu u. a., 2014]. In der Literatur wird eine erfolgreiche Aufreinigung der Taq DNA Polymerase oder des *Stoffel-Fragments* aus *Thermus aquaticus* über einen N-terminalen His-tag beschrieben [Dabrowski und Kur, 1998; Villbrandt u. a., 2000]. Die *SapI* Schnittstellen wurden so designed, dass sie passend zum Zielvektor pBSY2H4 sind, damit die GG Klonierung erfolgreich durchgeführt werden kann. Um eine große Ausbeute an Plasmiden zu erzielen, wurde als Replikationsursprung (eng. *origin of replication*; ORI) der Col E1 *origin* gewählt, da dieser für *high-copy* Plasmide codiert und somit für eine hohe Kopienzahl Plasmid in der Zelle sorgt [Camps, 2010].

Für die Antibiotika-Selektion wurde ein *Kan^R* mit konstitutivem Promotor designed. Dies ist wichtig, damit das *Kan^R* fortlaufend abgelesen wird. Da im Zielvektor pBSY2H4 ein *Amp^R* vorhanden ist, darf die Expressionskassette kein *Amp^R* besitzen.

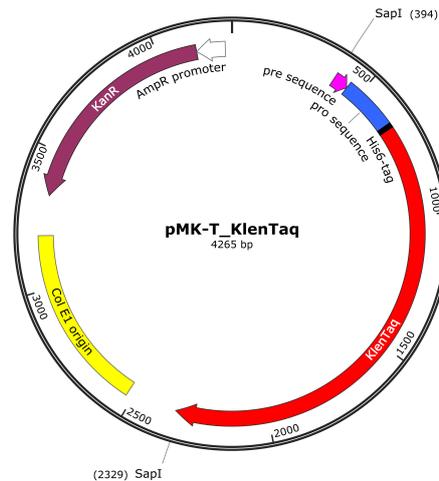


Abbildung 5.1: Plasmidkarte der bestellten Expressionskassette pMK-T_KlenTaq

Dargestellt ist das Plasmid pMK-T_KlenTaq mit den wichtigsten Bereichen.

5.2 Auxotrophie-Nachweis von *P. pastoris* BSY12MS

Bei dem, in dieser Arbeit verwendeten, *P. pastoris* Stamm, handelt es sich um den Histidin-auxotrophen Stamm BSY12MS. Dieser Stamm kann auf komplexen Medien wachsen, für das Wachstum auf Minimalmedium ist es jedoch notwendig, das Medium mit Histidin zu supplementieren. In dieser Arbeit wurde die Histidin-Auxotrophie des Wildtyps getestet, indem der Stamm zum einen auf einer Agarplatte mit Minimalmedium ausgestrichen wurde. Zum anderen wurde der Stamm auf einer Agarplatte mit Minimalmedium, welches mit 40 µg/ml Histidin supplementiert wurde, ausgestrichen. Die Agarplatten wurden für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

In Abbildung 5.2 ist deutlich erkennbar, dass der *P. pastoris* BSY12MS Stamm auf der Platte mit BMG2-Hefe-Minimalmedium kein Wachstum zeigt. Auf der Agarplatte, welche mit Histidin supplementiert wurde, ist eindeutiges Wachstum erkennbar.



Abbildung 5.2: Histidin-Auxotrophie-Nachweis des *P. pastoris* BSY12MS

Ausstrich von *P. pastoris* BSY12MS auf Agarplatte mit BMG2-Hefe-Minimalmedium ohne Histidin (links) und Ausstrich von *P. pastoris* BSY12MS auf Agarplatte mit BMG2-Hefe-Minimalmedium + 40 µg/ml Histidin (rechts). Inkubation bei 30 °C für 2 Tage.

5.3 Isolierung des Plasmid pBSY2H4 (bisy, Hofstätten/Raab) aus *E. coli* JM109

Zunächst wurde das Plasmid pBSY2H4 (bisy, Hofstätten/Raab) aus 25 ml einer *E. coli* JM109 Übernachtskultur isoliert (siehe Abschnitt 4.4.1).

Von der Übernachtskultur aus der das Plasmid pBSY2H4 isoliert wurde, wurde zudem die OD_{600} mittels Doppelbestimmung ermittelt, um die Plasmidanzahl pro Zelle bestimmen zu können. Mit $OD_{600} = 2,89$ und $OD_{600} = 2,84$ ergibt sich ein mittlerer Wert von $OD_{600} = 2,87$.

Die Plasmidkonzentration lag bei 599,9 ng/µl. Insgesamt konnten 30 µg Plasmid isoliert werden.

Das Absorptionsverhältnis bei dem Wellenlängenverhältnis A260/280 wies für jede Probe einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 auf, es lagen somit keine Verunreinigungen durch Proteine vor. Das Absorptionsverhältnis bei dem Wellenlängenverhältnis A260/230 wies für jede Probe einen Wert $> 2,0$ auf, es lagen somit zusätzlich keine Verunreinigungen durch organische Substanzen vor und die Proben konnten für weitere Arbeiten verwendet werden. Eine OD_{600} von 1 entspricht bei *E. coli* einem Zelltitert von 8×10^8 Zellen/ml [Myers u. a., 2013]. Mit dem Umrechnungsfaktor, dem Mittelwert der gemessenen OD_{600} der Übernachtskultur sowie dem zur Plasmidisolierung eingesetzten Volumen, lässt sich die Konzentration der eingesetzten Zellen berechnen. Anhand der Konzentration der eingesetzten Zellen, der Konzentration des Plasmids, dem Elutionsvolumen sowie der Plasmidgröße konnte die Anzahl an

Plasmiden pro Zelle berechnet werden (siehe Tab. 5.1).

Tabelle 5.1: Berechnung Anzahl Plasmid pBSY2H4/Zelle.

OD_{600} der Kultur	2,87	
Eingesetztes Volumen	3,00	ml
Umrechnungsfaktor ($OD_{600}=1$)	8×10^8	Zellen/ml
Eingesetzte Zellen	$6,89 \times 10^9$	Zellen/ml
Konzentration des Plasmids	599,9	ng/ μ l
Elutionsvolumen	50,00	μ l
Masse Plasmid	3×10^{-5}	g
Plasmidgröße	8660	bp
Molekulargewicht/bp	660,00	g/mol
Molekulargewicht Plasmid	$5,72 \times 10^6$	g/mol
Mol Plasmid	$5,25 \times 10^{-12}$	mol
Avogadro-Konstante	$6,02 \times 10^{23}$	Moleküle/mol
Plasmid-Moleküle	$3,16 \times 10^{12}$	Moleküle
Plasmide/Zelle	459	Plasmide/Zelle

Mit 459 Plasmiden/Zellen gehört pBSY2H4 zu den *high-copy* Plasmiden [Mayer, 1995]. Die Identität des Plasmid pBSY2H4 wurde mittels PCR überprüft (siehe Abschnitt 4.8, Tab. 4.5 und Tab. 4.9). Als Primer wurden die beiden Primer 16 und 17 gewählt, welche am AOX1-Promotor (pAOX1) bzw. am AOX1-Terminator (AOX1-TT) des Plasmids binden (siehe Abb. 5.3). Das Amplifikat dieser beiden Primer ist 644 bp groß.

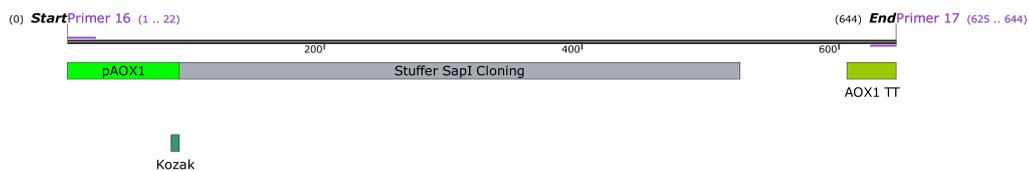


Abbildung 5.3: PCR-amplifizierter Bereich des Plasmids pBSY2H4.

Auf dem Agarose-Gel wurde in *lane* 1 der Marker (1 kb Plus DNA Ladder; NEB) zur Größenkontrolle aufgetragen, in *lane* 2 pBSY2H4 und in *lane* 3 ddH₂O als Negativ-Kontrolle (NK). Die auf dem Gel sichtbare Bande des PCR-Produkts entspricht der erwarteten Größe (644 bp).

Die Negativ-Kontrolle in *lane* 3 wies wie erwartet keine Bande auf.

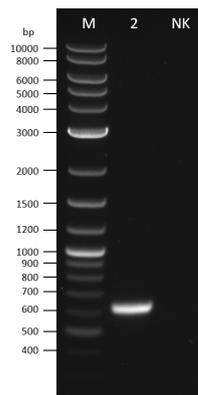


Abbildung 5.4: Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes pBSY2H4

Probenreihenfolge v. l. n. r.: DNA-Ladder [M], pBSY2H4(644 pb) [2], Negativ-Kontrolle (ddH₂O)[NK]; Gellauf: 1 % Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 100 V, Laufzeit 70 min.

5.4 Golden Gate Klonierung

Die GG Klonierung wurde wie in Abschnitt 4.7 beschrieben durchgeführt, um den Klonierungsvektor mit dem GOI, in diesem Fall Plasmid pMK-T-KlenTaq, in pBSY2H4 zu klonieren (siehe Abb. 5.5).

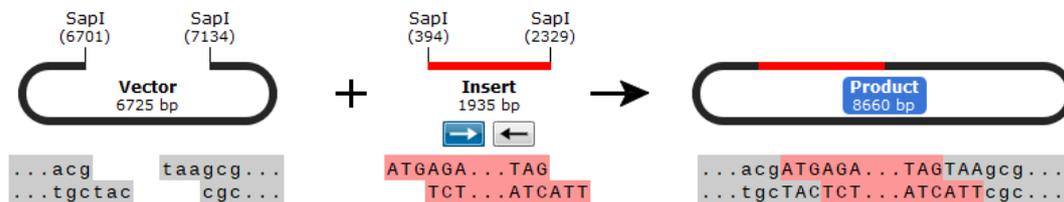


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der GG Klonierung

Der Vektor (pBSY2H4) wird durch das Restriktionsenzym *SapI* so geschnitten, dass in einem bestimmten Abstand zur Erkennungssequenz, die in der Abbildung grau hinterlegten Überhänge von drei Basen entstehen. Das Insert (pMK-T_KlenTaq) wird durch *SapI* so geschnitten, dass die rot hinterlegten Überhänge entstehen. Diese Überhänge sind komplementär zueinander, sodass in der GG Klonierungsreaktion das Produkt pBSY2H4_KlenTaq entsteht.

Das isolierte Plasmid pBSY2H4 Probe 4 lag in einer Konzentration von 583,35 ng/ μ l vor, weshalb die Probe zunächst 1/12 verdünnt wurde. Eine Kontrollmessung der Konzentration mittels NanoDrop ergab eine Konzentration von ca. 40 ng/ μ l für Plasmid pBSY2H4 und eine Konzentration von ca. 90 ng/ μ l für das bestellte Plasmid pMK-T_KlenTaq, das das Zielfragment trägt. Der GG-Ansatz wurde wie in Abschnitt 4.7 beschrieben durchgeführt und anschließend *E. coli* 5-alpha mit dem GG-Produkt transformiert. Für die Erfolgskontrolle der GG Klonierung wurde eine Check-PCR

(siehe Abschnitt 4.8, Tab. 4.5 und Tab. 4.9) durchgeführt und die beiden Primer 16 und 17 gewählt. Diese binden am AOX1-Promotor bzw. am AOX1-Terminator. Das erwartete Amplifikat ist 2151 bp groß (siehe Abb. 5.6).

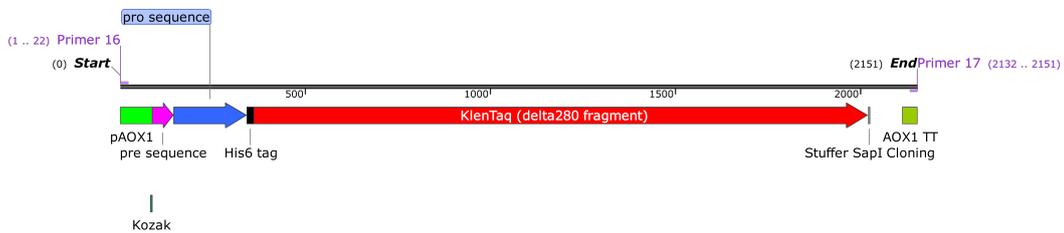


Abbildung 5.6: PCR-amplifizierter Bereich des Plasmids pBSY2H4_KlenTaq.

Auf dem Agarose-Gel wurde in *lane* 1 ein Marker (1 kb Plus DNA Ladder; NEB) zur Größenkontrolle aufgetragen, in *lane* 2 das PCR-Produkt des pBSY2H4, in *lane* 3 ddH₂O als Negativ-Kontrolle (NK) und in *lane* 4 das PCR-Produkt des GG-Ansatzes.

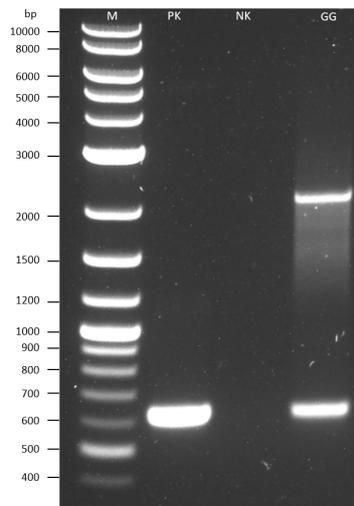


Abbildung 5.7: Überprüfung der GG Klonierung mittels Check-PCR und Gelelektrophorese

Probenreihenfolge v. l. n. r.: DNA-Ladder [M], PCR-Produkt des pBSY2H4(644 pb) [PK], Negativ-Kontrolle (ddH₂O)[NK], GG-Ansatz [GG]; Gellauf: 1 % Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 100 V, Laufzeit 70 min.

Die auf dem Gel sichtbare Bande in *lane* 2 [PK] konnte dem PCR-Produkt des pBSY2H4 (644 bp) zugeordnet werden (siehe Abschnitt 5.3) und diente als Positiv-Kontrolle. Die Negativ-Kontrolle [NK] in *lane* 3 wies wie erwartet keine Bande auf. In *lane* 4 wurde das PCR-Produkt des GG-Ansatzes [GG] aufgetragen, hier waren

zwei Banden sichtbar. Eine Bande lag bei ca. 2000 bp und konnte somit dem Plasmid pBSY2H4_KlenTaq (2151 bp) zugeordnet werden. Eine weitere Bande befand sich bei ca. 600 bp, also auf Höhe des PCR-Produktes des pBSY2H4. Dies deutete darauf hin, dass der GG-Ansatz aus einem Gemisch aus Endprodukt pBSY2H4_KlenTaq und pBSY2H4 bestand. Da jedoch eine Bande auf Höhe des Endproduktes vorhanden war, konnte davon ausgegangen werden, dass die Klonierung des Expressionsvektors funktioniert hat und der GG-Ansatz in weiteren Arbeiten verwendet werden konnte.

5.5 Transformation elektrokompenter *E. coli* 5-alpha

Um *E. coli* 5-alpha durch die Plasmide pBSY2H4, pMK-T_KlenTaq sowie den GG-Ansatz zu transformieren, wurden die *E. coli* 5-alpha Zellen zunächst elektrokompent gemacht (siehe Abschnitt 4.3.1). Wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben, wurden fünf Transformationen durch Elektroporation durchgeführt. Die Spannungswerte und Elektroporationszeiten sind in Tabelle 5.2 gelistet.

Tabelle 5.2: Daten Elektroporation *E. coli*.

Probe	Menge [μ l]	Spannung [V]	Zeitkonstante [ms]
pMK-T_KlenTaq	1	1610	4,5
pBSY2H4	1	1590	4,1
pBSY2H4_KlenTaq	1	1570	3,7
pBSY2H4_KlenTaq	5	1470	2,5
ddH ₂ O	1	1610	4,5

Wie erwartet waren auf allen vier LB+Kan-Agarplatten, auf denen der Transformationsansatz des Plasmides pMK-T_KlenTaq ausgestrichen wurde sowie auf den beiden LB+Amp-Agarplatten auf denen der Transformationsansatz des Plasmides pBSY2H4 ausgestrichen wurde, Kolonien gewachsen und auf den H₂O-Kontrollplatten waren erwartungsgemäß keine Kolonien gewachsen. Des Weiteren sind auf allen vier LB+Amp-Agarplatten des GG-Transformationsansatzes wie zu erwarten Kolonien gewachsen, wobei deutlich wird, dass die Transformation von 1 μ l ausreichend war. Auf der H₂O-Kontrollplatte sind erwartungsgemäß keine Kolonien gewachsen.

Von der LB+Amp (100 μ g/ml)-Agarplatte, auf die 100 μ l des 1 μ l pBSY2H4_KlenTaq-Transformationsansatzes ausplattiert wurden, erfolgte eine Überprüfung von fünf Einzelkolonien (Klonen) mittels Check-PCR und Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden die Proben wie in Abschnitt 4.8, bzw. Tabelle 4.5 beschrieben vorbereitet, die Check-PCR (Tab. 4.9) mit Primer 16 und 17 gestartet und nachfolgend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

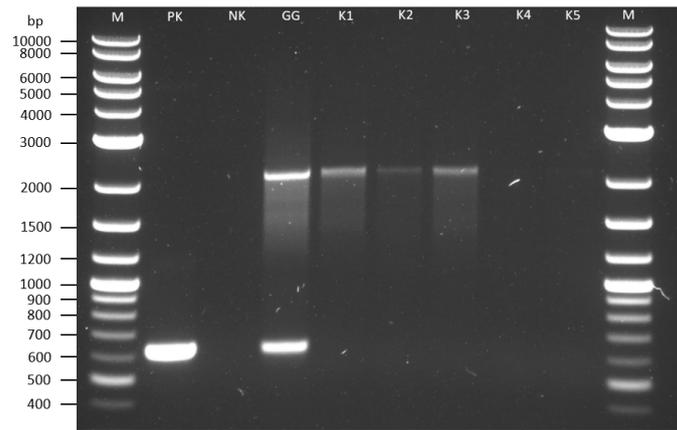


Abbildung 5.8: Überprüfung von Transformanten mittels Check-PCR und Gelelektrophorese

Probenreihenfolge v. l. n. r.: DNA-Ladder [M], pBSY2H4(644 pb) [PK], Negativ-Kontrolle (ddH₂O)[NK], GG-Ansatz [GG], Klon 1 [K1], Klon 2 [K2], Klon 3 [K3], Klon 4 [K4], Klon 5 [K5], DNA-Ladder [M]; Gellauf: 1 % Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 100 V, Laufzeit 70 min.

Bei Klon 1 bis Klon 3 war ein positives Signal auf Höhe des PCR-Produktes pBSY2H4_KlenTaq (2151 bp) sichtbar. Bei Klon 4 war keine Bande zu sehen und bei Klon 5 konnte nur eine schwache Bande auf Höhe des PCR-Produktes pBSY2H4_KlenTaq (2151 bp) erahnt werden.

Zusätzlich wurde aus jeder Übernachts-Flüssigkultur der Klone 1-5 auf je einer LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Amp sowie einer LB-Agarplatte + 50 µg/ml Kan ein 3-Ösen-Ausstrich gemacht. Es wurde deutlich, dass die Klone auf den LB-Agarplatten mit Ampicillin wachsen, auf den LB-Agarplatten mit Kanamycin war kein Wachstum zu erkennen.

Alle weiterführenden Arbeiten wurden mit Klon 1 durchgeführt.

5.6 Isolierung des Plasmid pBSY2H4_KlenTaq aus *E. coli* 5-alpha

Nach der erfolgreichen Transformation von *E. coli* 5-alpha durch das Plasmid pBSY2H4_KlenTaq wurden zwei Proben dieses Expressionsvektors wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben isoliert und zur Überprüfung der Reinheit die Absorption als Doppelbestimmung gemessen. Des Weiteren wurde die Konzentration des Plasmides bestimmt.

Die Konzentration der Probe 1 des Plasmid pBSY2H4_KlenTaq lag bei 442,2 ng/ μ l nach der ersten Elution und bei 138,6 ng/ μ l nach der zweiten Elution. Die Konzentration der Probe 2 des Plasmid pBSY2H4_KlenTaq lag bei 502,2 ng/ μ l nach der ersten Elution und bei 121,0 ng/ μ l nach der zweiten Elution. Es wurde deutlich, dass eine Elution ausreicht, um den größten Teil des Expressionsvektors zu eluieren, eine komplette Elution wurde jedoch mit nur einem Elutionsschritt nicht erreicht. Des Weiteren wurde deutlich, dass das Absorptionsverhältnis bei dem Wellenlängenverhältnis A260/280 für jede Probe für die erste Elution einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 aufwies und somit keine Verunreinigungen durch Proteine vorlagen. Das Absorptionsverhältnis bei dem Wellenlängenverhältnis A260/230 wies für jede Probe der ersten Elution einen Wert größer als 2 auf. Es lagen somit zusätzlich keine Verunreinigungen durch organische Substanzen vor.

5.7 Linearisierung des Plasmid pBSY2H4_KlenTaq

Zur Linearisierung des Expressionsvektors pBSY2H4_KlenTaq wurde ein Reaktionsansatz zur Plasmid-Linearisierung angesetzt (siehe Abschnitt 4.5, Tab. 4.2). Der Reaktionsansatz wurde mit einer Plasmidkonzentration von 18,89 μ l pro Reaktion angesetzt. Nach erfolgter Linearisierung, Aufkonzentrierung und Waschen erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung des linearisierten pBSY2H4_KlenTaq mittels NanoDrop sowie eine Agarose-Gelelektrophorese zur Erfolgskontrolle. Die Messung im NanoDrop ergab eine Konzentration von 919,2 ng/ μ l für den linearisierten Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq. Zur Erfolgskontrolle wurde auf dem Agarosegel neben den DNA-Laddern auch das zirkuläre Plasmid (*lane* 3) aufgetragen. Wie erwartet liegt eine dominante Bande des linearisierten pBSY2H4_KlenTaq bei ca. 9000 bp. Die schwache obere Bande kommt vermutlich durch entspannt zirkuläre DNA zustande.

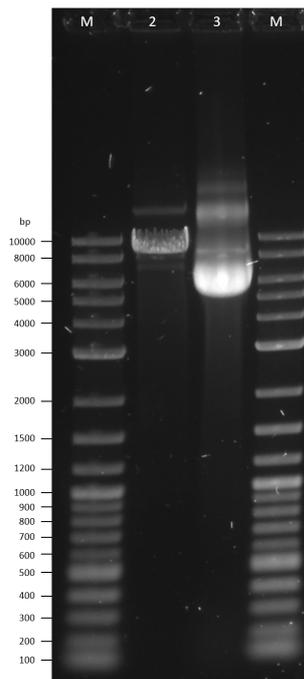


Abbildung 5.9: Überprüfung der Plasmid-Linearisierung mittels Gelelektrophorese

Probenreihenfolge v. l. n. r.: DNA-Ladder [M], linearisiertes pBSY2H4_KlenTaq(8660 pb) [2], zirkuläres pBSY2H4_KlenTaq(8660 pb) [3], DNA-Ladder [M]; Gellauf: 1 % Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit GelGreen, Spannung 100 V, Laufzeit 60 min.

Die Linearisierung des pBSY2H4_KlenTaq war erfolgreich und der linearisierte Expressionsvektor konnte für die Transformation in *P. pastoris* eingesetzt werden.

5.8 Transformation elektrokompenter *P. pastoris*

5.8.1 Herstellung elektrokompenter *P. pastoris*

Für die Herstellung elektrokompenter *P. pastoris* wurden, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, Vorkulturen angesetzt und deren optische Dichte bei 600 nm mittels Spektralphotometer gemessen. Die OD_{600} betragen 1,37 und 2,1. Nach Vereinigung und Herstellung der drei Hauptkulturen wurde die Start- OD_{600} gemessen: Hauptkultur 1 ergab eine Start- OD_{600} von 0,252, Hauptkultur 2 ergab eine Start- OD_{600} von 0,250 und Hauptkultur 3 ergab eine Start- OD_{600} von 0,255. Die Start- OD_{600} lag bei allen drei Hauptkulturen bei ca. 0,25.

Die Hauptkultur 3 wurde zur OD_{600} -Bestimmung verwendet, indem im 20-30 min Takt die OD_{600} gemessen wurde, bis eine OD_{600} von 0,9 erreicht wurde. Dann wurde auch die OD_{600} der Hauptkulturen 1 und 2 gemessen (siehe Tab. 5.3).

Tabelle 5.3: OD_{600} -Messung der Hauptkultur 3 bis zu einer OD_{600} von 0,9.

Hauptkultur	Uhrzeit	Zeit [h]	Gemessene OD_{600}	Verdünnung (1:X)	OD_{600}
3	08:53	0,00	0,255	1	0,255
3	09:22	0,48	0,302	1	0,302
3	09:52	0,98	0,381	1	0,381
3	10:22	1,48	0,438	1	0,438
3	10:45	1,87	0,498	1	0,498
3	11:18	2,42	0,313	2	0,626
3	11:48	2,92	0,385	2	0,770
3	12:12	3,32	0,449	2	0,898
1	12:30	3,62	0,454	2	0,908
2	12:30	3,62	0,447	2	0,894

Aus den Messdaten der Hauptkultur 3 (Tab. 5.3) wurden Abb. 5.10 und 5.11 erstellt, indem die OD_{600} gegen die Zeit aufgetragen wurde.

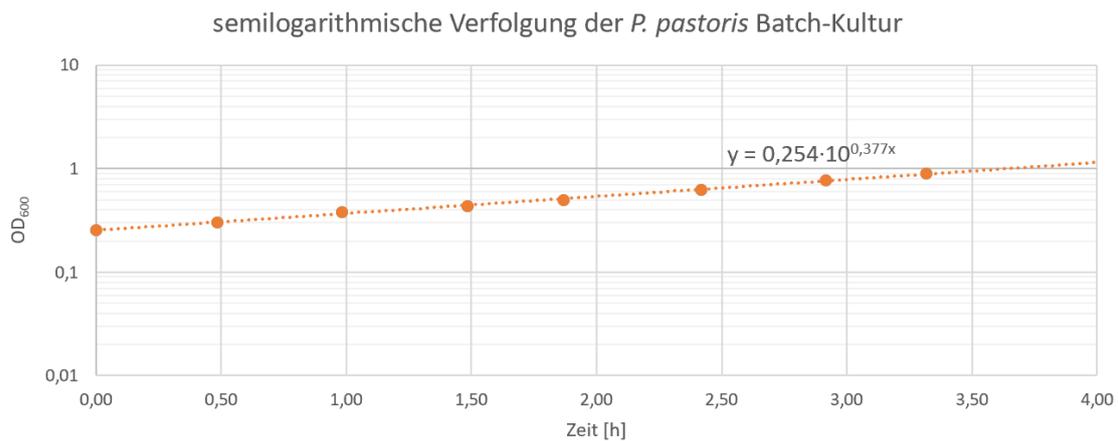


Abbildung 5.10: Semilogarithmische Verfolgung der *P. pastoris* Batch-Kultur
 Von der *P. pastoris* Hauptkultur 3 wurde in regelmäßigen Abständen die OD_{600} gemessen bis eine OD_{600} von 0,9 erreicht war. Die OD_{600} wurde semilogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen.

Bei der semilogarithmischen Verfolgung der *P. pastoris* Batch-Kultur wurde aus der Steigung die spezifische Wachstumsrate $\mu = 0,377 \text{ h}^{-1}$ bestimmt.

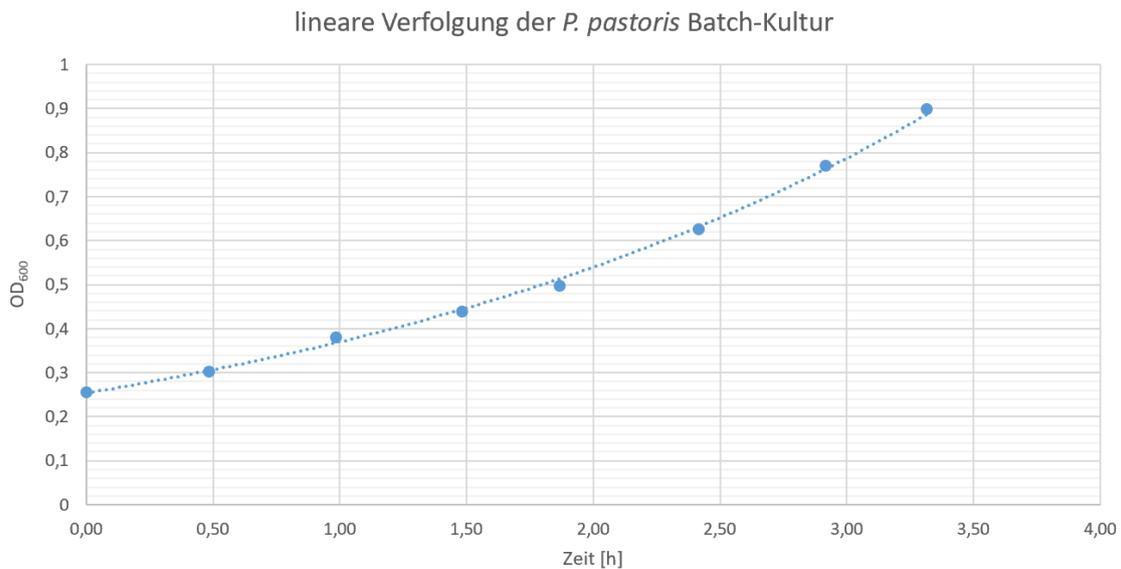


Abbildung 5.11: Lineare Verfolgung der *P. pastoris* Batch-Kultur

Von der *P. pastoris* Hauptkultur 3 wurde in regelmäßigen Abständen die OD_{600} gemessen bis eine OD_{600} von 0,9 erreicht war. Die OD_{600} wurde linear gegen die Zeit aufgetragen.

5.8.2 Transformation *P. pastoris*

Für die Transformation von *P. pastoris* wurde der linearisierte Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq (siehe Abschnitt 4.5) eingesetzt. Als Negativ-Kontrollen dienten ddH₂O sowie das zirkuläre Plasmid pBSY2H4_KlenTaq.

1 μl linearisiertes Plasmid pBSY2H4_KlenTaq \rightarrow 919,2 ng/ μl \cdot 1 μl \approx 1 μg

2,12 μl zirkuläres Plasmid pBSY2H4_KlenTaq \rightarrow 472,45 ng/ μl \cdot 2,12 μl \approx 1 μg

2,12 μl H₂O

Tabelle 5.4: Daten Elektroporation *P. pastoris*.

Probe	Menge [μl]	Spannung [V]	Zeitkonstante [ms]
linearisiertes pBSY2H4_KlenTaq	1	2430	5,6
zirkuläres pBSY2H4_KlenTaq	2,12	2430	5,6
ddH ₂ O	2,12	2430	5,6

Die Transformationsansätze wurden nach dem in Abschnitt 4.3.4 beschriebenen Waschschrift auf den jeweiligen Agarplatten mit BMG2 Hefe Minimalmedium aus-

plattiert. Nach vier Tagen Inkubationszeit bei RT war auf jeder Agarplatte Wachstum zu erkennen, wobei jedoch visuelle Unterschiede zwischen den Kolonien erkennbar waren. Die Agarplatten, auf welche der *P. pastoris*-Stamm mit transformiertem, linearen Expressionsvektor ausplattiert wurde, wiesen deutlich größere Kolonien auf als die Wasser-Kontrolle sowie die des *P. pastoris*-Stamm mit transformiertem, zirkulären pBSY2H4_KlenTaq (siehe Abb 5.12).

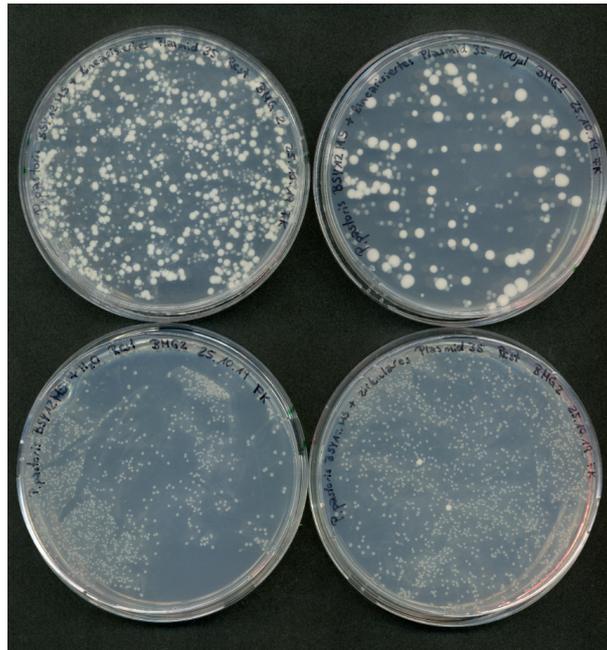


Abbildung 5.12: Agarplatten BMG2 Minimalmedium und ausplattierten Transformationsansätzen nach 4 Tagen Inkubation bei RT

Auf der Platte oben links wurde der Rest des *P. pastoris* BSY12MS Stamm + linearisiertem pBSY2H4_KlenTaq ausplattiert, auf der Platte oben rechts wurden 100 μ l des *P. pastoris* BSY12MS Stamm + linearisiertem pBSY2H4_KlenTaq ausplattiert, auf der Platte unten links wurde der Rest des *P. pastoris* BSY12MS Stamm + ddH₂O ausplattiert, auf der Platte unten rechts wurde der Rest des *P. pastoris* BSY12MS Stamm + zirkulärem pBSY2H4_KlenTaq ausplattiert. Bei allen Platten handelt es sich um BMG2 Agarplatten.

Bei den Kolonien, die auf den beiden Kontrollplatten gewachsen sind, handelt es sich wahrscheinlich nicht um transformierte *P. pastoris* Kolonien, sondern um Hintergrund, der mit der langen Inkubationszeit zu begründen ist. Diese Annahme wurde kontrolliert, indem sechs Einzelkolonien der großen Klone, sowie eine Einzelkolonie eines kleinen Klons erneut auf BMG2 Minimalmedium ausgestrichen wurden.



Abbildung 5.13: Agarplatten mit Ausstrich der 6 großen Klone

Die sechs Klone wurden mittels 3-Ösen-Ausstrich auf je einer BMG2-Agarplatte ausgestrichen. Auf jeder Platte ist ein Wachstum erkennbar.



Abbildung 5.14: Agarplatte mit Ausstrich des kleinen Klons

Der kleine Klon wurde mittels 3-Ösen-Ausstrich auf einer BMG2-Agarplatte ausgestrichen. Es ist ein schwaches Wachstum erkennbar.

Es wird in Abb. 5.13 und Abb. 5.14 deutlich, dass die großen Klone der Transformation des linearisierten Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq durch das *His4*-Gen die Fähigkeit erlangten auf Minimalmedium ohne Histidin zu wachsen, während der kleine Klon ein deutlich schwächeres Wachstum aufwies, weshalb mit diesem Klon nicht weiter gearbeitet wurde.

5.9 Genomische Charakterisierung von Expressionsstämmen

Die genomische DNA des Klon 1, Klon 3 und Klon 5 wurde mit Primer 18 und Primer 19 amplifiziert, um den gewünschten Einbau der linken Flanke des integrierten Vektors in die gDNA zu überprüfen. Primer 18 bindet dabei auf dem Genom von *P. pastoris* BSY12MS und Primer 19 bindet auf dem Plasmid pBSY2H4_KlenTaq. In Abb. 5.15 wurde die PCR-Amplifikation anhand von SnapGene simuliert. Dieses PCR-Produkt weist in der Theorie eine Größe von 1379 bp auf.

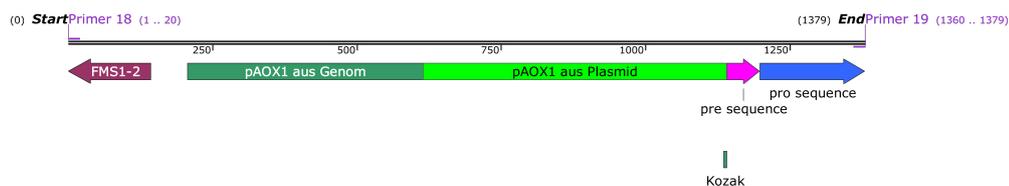


Abbildung 5.15: Simulation PCR-Amplifikation des Klon 1 mit Primer 18/19.

Die PCR-Amplifikation mit Primer 17 und 18 wurde mit dem *P. pastoris* BSY12MS WT sowie dem Klon 1 durchgeführt. Beide Primer binden auf der gDNA des *P. pastoris* BSY12MS Stamms und schließen das beim Klon 1 den integrierten Vektor ein. In Abbildung 5.16 wurde die PCR-Amplifikation des WT anhand von SnapGene simuliert. Dieses PCR-Produkt weist in der Theorie eine Größe von 1209 bp auf und in Abb. 5.17 wurde die PCR-Amplifikation des *P. pastoris* BSY12MS Stamms mit integriertem Vektor ebenfalls anhand von SnapGene simuliert. Dieses PCR-Produkt weist in der Theorie eine Größe von 3205 bp auf.

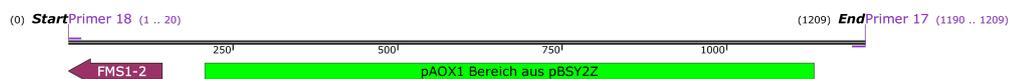


Abbildung 5.16: Simulation PCR-Amplifikation des *P. pastoris* BSY12MS WT mit Primer 17/18.

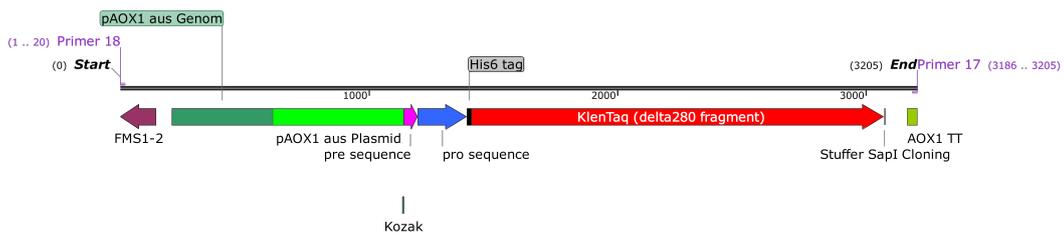


Abbildung 5.17: Simulation PCR-Amplifikation des Klon 1 mit Primer 17/18.

Um den gewünschten Einbau der rechten Flanke des integrierten Vektors in die gDNA zu überprüfen wurde die DNA des Klon 1, Klon 3 und Klon 5 mit den Primern 17 und 20 amplifiziert. Primer 17 bindet auf dem Genom von *P. pastoris* BSY12MS und Primer 20 bindet auf dem integrierten Plasmid. Dieses PCR-Produkt weist in der Theorie eine Größe von 1037 bp auf.

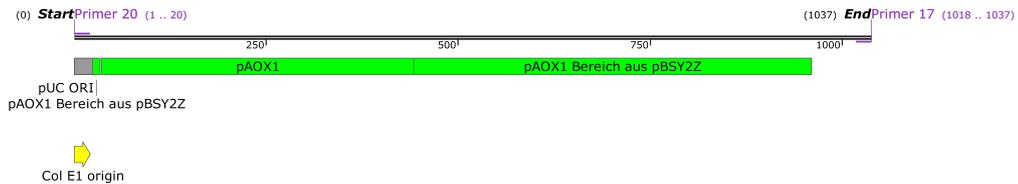


Abbildung 5.18: Simulation PCR-Amplifikation des Klon 1 mit Primer 17/20.

Es wurde bei der Amplifikation des *P. pastoris* BSY12MS WT kein PCR-Produkt erwartet, da das Plasmid pBSY2H4_KlenTaq und somit Primer 20 nicht vorhanden ist.

Die Isolierung der genomischen DNA aus *P. pastoris* erfolgte wie im Methodenteil in Abschnitt 4.4.2 beschrieben.

Zur Kontrolle, ob die Isolierung der gDNA aus *P. pastoris* mittels EtNa-Protokoll erfolgreich war, wurde eine PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Da die isolierten Klone zudem auf den gewünschten Einbau des linearen Vektors in die genomische pAOX1-Gensequenz überprüft werden sollten (siehe Abschnitt 4.13), wurde eine PCR mit der Phusion Hot Start II DNA Polymerase durchgeführt (siehe Abschnitt 4.8, Tab. 4.7 und 4.10). Die PCR Produkte wurden dann auf ein Agarosegel geladen (siehe Abb. 5.19).

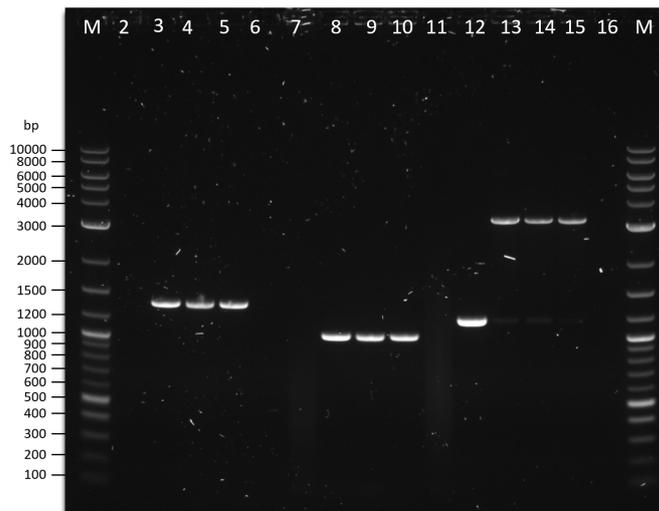


Abbildung 5.19: Überprüfung der Transformanden mittels Sequenzierungs-PCR und Gelelektrophorese

Probenreihenfolge v. l. n. r.: DNA-Ladder [M], *P. pastoris* BSY12MS (PM18/19) [2], Klon 1 (PM18/19) [3], Klon 3 (PM18/19) [4], Klon 5 (PM18/19) [5], Negativ-Kontrolle (ddH₂O)(PM18/19)[6], *P. pastoris* BSY12MS (PM17/20) [7], Klon 1 (PM17/20) [8], Klon 3 (PM17/20) [9], Klon 5 (PM17/20) [10], Negativ-Kontrolle (ddH₂O)(PM17/20)[11], *P. pastoris* BSY12MS (PM17/18) [12], Klon 1 (PM17/18) [13], Klon 3 (PM17/18) [14], Klon 5 (PM17/18) [15], Negativ-Kontrolle (ddH₂O)(PM17/18)[16], DNA-Ladder [M]; Gellauf: 1 % Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 100 V, Laufzeit 70 min.

Es wurde bei der Amplifikation des *P. pastoris* BSY12MS WT mit den Primern 18 und 19 kein PCR-Produkt erwartet, da das Plasmid pBSY2H4_KlenTaq und somit Primer 19 nicht vorhanden war. Durch die Agarose-Gelelektrophorese wurden die Erwartungen bestätigt. In Abb. 5.19 war wie erwartet in *lane* 2 keine Bande sichtbar und die Banden der Klone 1, 3 und 5 (*lane* 3, 4 und 5) lagen mit ca. 1350 bp auf der erwarteten Höhe. In *lane* 7 war wie erwartet keine Bande sichtbar und die Banden der Klone 1, 3 und 5 (*lane* 8, 9 und 10) lagen mit ca. 1000 bp auf der erwarteten Höhe. Es wurde deutlich, dass in *lane* 12 eine Bande des WT auf Höhe von ca. 1200 bp sichtbar war. Diese Bande liegt ebenfalls auf der erwarteten Höhe. Die Banden der Klone 1, 3 und 5 (*lane* 13, 14 und 15) lagen mit etwas über 3000 bp im erwarteten Bereich. Da bei den Banden der Klone 1, 3 und 5, die mit dem Primermix 17/18 amplifiziert wurden, schwache Banden auf Höhe des *P. pastoris* BSY12MS WT zu sehen waren, wird vermutet, dass es sich nicht um Reinkulturen handelt.

Das PCR-Produkt des *P. pastoris* WT sowie die des Klon 1 wurden, wie in Abschnitt 4.9.1 beschrieben, aufgereinigt bevor sie zur Sequenzierung verschickt wurden. Durch die Aufreinigung sollen PCR-Bestandteile wie dNTPs, Primer und Polymerasen entfernt werden, da diese bei der Sequenzierung stören würden.

5.9.1 Teilsequenzierung des Klon 1

Um den gewünschten Einbau des linearen Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq in das *P. pastoris* Genom auf Ebene der DNA-Sequenz zu bestätigen, wurde die Sequenzierung von ausgewählten PCR-Produkten aus Abschnitt 5.9 in Auftrag gegeben.

Die gewählten PCR-Produkte um die Flanken am Übergang der gDNA zum integrierten Vektor zu sequenzieren sowie die Primer mit welchen das jeweilige PCR-Produkt sequenziert wurde sind in Tabelle 5.5 gelistet.

Tabelle 5.5: PCR-Produkte und Primer für Sequenzierung der Übergänge des *P. pastoris* Genoms mit integriertem Vektor.

PCR-Produkt	Sequenzierungs-Primer	Übergangsflanke
Klon 1 mit Primerpaar 18/19	18	links
Klon 1 mit Primerpaar 18/19	19	links
Klon 1 mit Primerpaar 17/20	20	rechts

In Abbildung 5.20 und 5.21 ist die schematische Darstellung der Sequenzierung der linken und rechten Flanke abgebildet. Die dargestellten Pfeile zwischen den Primern decken den sequenzierten DNA-Bereich ab. Die ausgefüllten Bereiche des Pfeils symbolisieren eindeutig übereinstimmende DNA-Sequenzen, während bei den nicht aufgefüllten Bereichen der Pfeile keine eindeutige Sequenzierung möglich war.

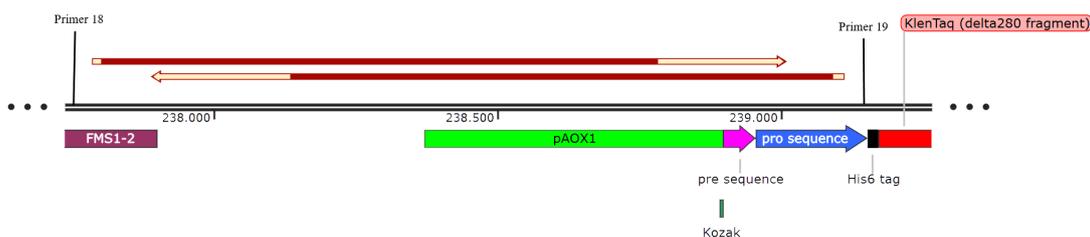


Abbildung 5.20: Sequenzierung des Klon 1 (Primer 18/19)

Primer 18 bindet auf dem *P. pastoris* BSY12MS Genom und Primer 19 auf der DNA des integrierten Expressionsvektors pBSY2H4_KlenTaq.

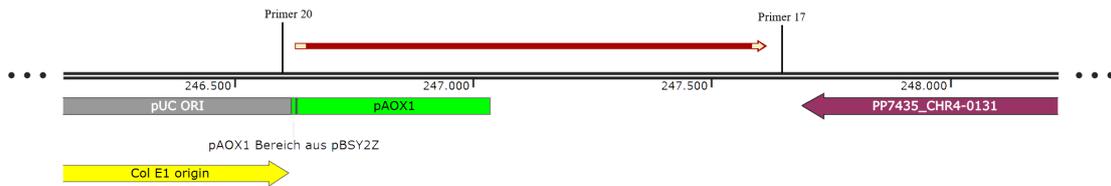


Abbildung 5.21: Sequenzierung des Klon 1 (Primer 17/20)

Primer 17 bindet auf dem *P. pastoris* BSY12MS Genom und Primer 20 auf der DNA des integrierten Expressionsvektors pBSY2H4_KlenTaq.

Der Primer 18 bindet im *P. pastoris* BSY12MS Genom und Primer 19 im integrierten Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq. Die entstehende linke Flanke am Übergang zwischen genomischer *P. pastoris* DNA und der des integrierten Expressionsvektors pBSY2H4_KlenTaq konnte mit diesen Primern sequenziert und auf Richtigkeit bestätigt werden (siehe Abb. 5.20).

Der Primer 17 bindet im *P. pastoris* BSY12MS Genom und Primer 20 im integrierten Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq. Die entstehende rechte Flanke am Übergang zwischen genomischer *P. pastoris* DNA und der des integrierten Expressionsvektors pBSY2H4_KlenTaq konnte mit diesen Primern sequenziert und auf Richtigkeit bestätigt werden (siehe Abb. 5.21).

Durch die Sequenzierung des PCR-Produkts des Klon 1, welches mit dem Primerpaar 17/18 amplifiziert (siehe Abschnitt 5.9) und mit Primer 17 sequenziert wurde, konnten ca. 50 % der KlenTaq DNA Polymerase vom C-terminalen DNA-Sequenzbereich aus als richtig bestätigt werden (siehe Abb. 5.22).

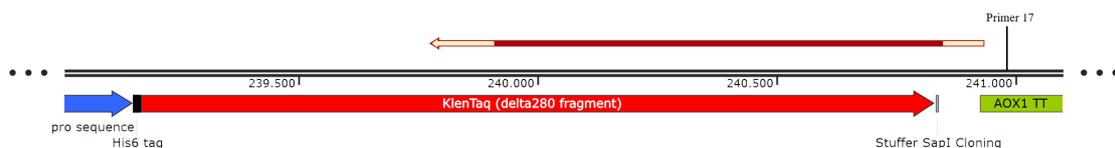


Abbildung 5.22: Sequenzierung des Klon 1 (Primer 17/18)

Sequenzierung des C-terminalen Bereichs der KlenTaq DNA Polymerase.

5.9.2 Teilsequenzierung des *P. pastoris* Genoms

Zu Beginn der Erstellung dieser Arbeit wurde angenommen, dass der *P. pastoris* BSY12MS Hefestamm dem *P. pastoris* BSYBG11 Hefestamm entspricht. Im Laufe dieser Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass Unterschiede in der Sequenz vorliegen müssen, da der *P. pastoris* BSY12MS Stamm ca. 200 bp kleiner ist als der Referenzstamm BSYBG11.

Aus diesem Grund wurde eine Sequenzierung der in Tabelle 5.6 aufgeführten PCR-Produkte der beiden Hefestämme mit den gelisteten Primern in Auftrag gegeben.

Tabelle 5.6: PCR-Produkte und Primer für Sequenzierung des *P. pastoris* BSY12MS und *P. pastoris* BSYBG11 Genoms.

PCR-Produkt	Sequenzierungs-Primer
<i>P. pastoris</i> BSY12MS mit Primerpaar 16/83	83
<i>P. pastoris</i> BSY12MS mit Primerpaar 17/82	82
<i>P. pastoris</i> BSYBG11 mit Primerpaar 16/83	83
<i>P. pastoris</i> BSYBG11 mit Primerpaar 17/82	82

In Abbildung 5.23 wird sichtbar, dass die Sequenzen deutliche Unterschiede aufweisen. Bei dieser Abbildung geht es nicht darum, die genauen Unterschiede der einzelnen Basen zu erkennen, ein detaillierteres Alignment der beiden *P. pastoris* Stämme befindet sich in Anhang A.2.1. Es wird jedoch deutlich, dass der *P. pastoris* BSY12MS WT im Vergleich zum *P. pastoris* BSYBG11 WT um einige Basen verkürzt ist. Durch das Alignment in Anhang A.2.1 wird erkennbar, dass der *P. pastoris* BSY12MS WT im Vergleich zum *P. pastoris* BSYBG11 WT in dem sequenzierten Bereich um 216 bp verkürzt ist.

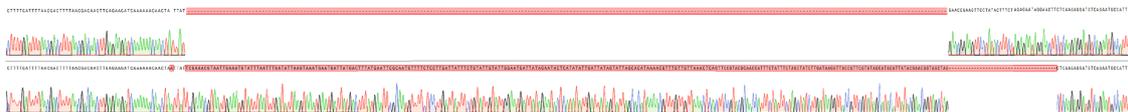


Abbildung 5.23: Sequenzierung des *P. pastoris* WT

Darstellung des Sequenz-Alignments des *P. pastoris* BSY12MS (obere Sequenz) und *P. pastoris* BSYBG11 (untere Sequenz); Unstimmige Basen sind rot hinterlegt.

5.10 Expression KlenTaq DNA Polymerase

Mittels *small-scale* Expression sollte überprüft werden, ob *P. pastoris* BSY12MS + KlenTaq Klon 1, 3 und 5 die KlenTaq DNA Polymerase exprimiert in das Medium sekretiert.

Hierfür wurde der Inhalt jedes *wells* (6,5 ml) nach der Zellernte in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 4000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand jedes Zentrifugenröhrchens in ein neues überführt und die Zellpellets zur Lagerung vorbereitet (*small-scale* Expression der Klone 1, 3 und 5). Dafür wurden die Pellets in 6,5 ml Saline resuspendiert und die OD_{600} auf 13 eingestellt. Die Einstellung der OD_{600} auf 13 erzielte erfahrungsgemäß gute Ergebnisse [Goetz, 2019].

Eine $OD_{600} = 1$ entspricht $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml. Eine $OD_{600} = 13$ entspricht somit einem Zelltitert von $1,95 \times 10^8$ Zellen/ml. Hierfür wurden 2 ml der jeweiligen Kultur zentrifugiert und das Pellet dann in dem entsprechenden Volumen Saline resuspendiert, um die Proben auf eine $OD_{600} = 13$ einzustellen.

Die Überstände sowie die gelösten Zellpellets wurden bei 4°C bzw. bei -20°C gelagert. Die Zellpellets der *small-scale* Expression des Klon 1 wurden verworfen. Zur Auswertung wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dafür wurden die Pellets zunächst mittels Ultraschall aufgeschlossen und Überstände, sowie aufgeschlossene Zellpellets auf das Gel aufgegeben.

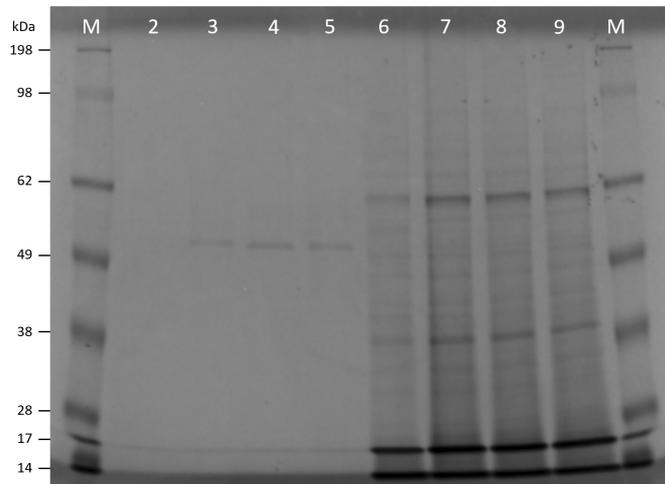


Abbildung 5.24: Vergleich der kultivierten KlenTaq DNA Polymerase Klon 1, 3 und 5, sowie des *P. pastoris* BSY12MS WT

Probenreihenfolge v. l. n. r.: Marker [M], Überstand *P. pastoris* BSY12MS WT [1], Überstand *P. pastoris* BSY12MS + KlenTaq DNA Polymerase Klon 1 [2], Überstand *P. pastoris* BSY12MS + KlenTaq DNA Polymerase Klon 3 [3], Überstand *P. pastoris* BSY12MS + KlenTaq DNA Polymerase Klon 5 [4], Pellet *P. pastoris* BSY12MS WT [5], Pellet *P. pastoris* BSY12MS + KlenTaq DNA Polymerase Klon 1 [6], Pellet *P. pastoris* BSY12MS + KlenTaq DNA Polymerase Klon 3 [7], Pellet *P. pastoris* BSY12MS + KlenTaq DNA Polymerase Klon 5 [8], Marker [M]; SDS-PAGE: 10 % Acrylamid ohne SDS; Laufpuffer: Rotiphorese SDS Page; Laufbedingungen 250 V, 40 min; Marker: See-Blue Plus2 Pre-Stained Protein Standard; Färbelösung: Roti[®]-Blue quick ready-to-use 1x Lösung.

In Abbildung 5.24 wird deutlich, dass der *P. pastoris* BSY12MS WT so gut wie keine nativen Proteine in das Medium sekretiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei allen drei Klonen ein Protein in den Überstand sekretiert wurde, da in *lane* 3, 4 und 5 je eine Bande auf gleicher Höhe (ca. 52 kDa) sichtbar war. Das Pellet des *P. pastoris* BSY12MS WT zeigte auf dieser Höhe keine Bande, während in *lane* 7, 8 und 9 (Pellets der Klone) leichte Banden zu erkennen sind. Diese und die anderen Banden der *lanes*, in der die Pellets aufgetragen wurden, sind durch intrazelluläre

Proteine zu begründen. Die Auswertung mittels SDS-PAGE der zweiten *small-scale* Expression des Klon 1 wurde nach Aufreinigung anhand von *beads* durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Abschnitt 5.11 aufgeführt.

Beim Betrachten der Banden in *lane* 3, 4 und 5 wurde deutlich, dass die Größe nicht den erwarteten 62 kDa entspricht. Die Banden laufen auf einer Größe von ca. 52 kDa und somit etwa 10 kDa unter dem theoretischen Wert. Da das Protein jedoch immer auf gleicher Höhe liegt und im WT fehlt, wird davon ausgegangen, dass die falsche Höhe der Bande nicht durch ein anderes Protein zustande kommt, sondern andere Ursachen verantwortlich sind. Eine Fehlerquelle könnte sein, dass aliquotiertes DTT verwendet wurde, welches schon einige Zeit eingefroren gelagert wurde. Durch Alterung wurden möglicherweise die Disulfidbrücken nicht komplett reduziert. Die SDS-PAGE sollte noch einmal wiederholt werden und statt DTT Mercaptoethanol als reduzierendes Reagenz verwendet werden. Zudem wurde ein prestained Marker (SeeBlue™Plus2 Pre-stained Protein Standard) verwendet, welcher aufgrund des *lablings* weniger präzise ist [Vorhoff, 2019].

Bei Wiederholung der SDS-PAGE sollte möglichst ein unstained Proteinmarker benutzt werden.

Um die Annahme zu stützen, dass es sich bei den Banden in *lane* 3, 4 und 5 um das Zielprotein handelt, wurde die von VWR gekaufte peqGold Taq DNA Polymerase unter gleichen Bedingungen auf eine SDS-PAGE aufgetragen (siehe Abbildung 5.25). Diese Standard Taq DNA Polymerase ist ca. 94 kDa groß [Vorhoff, 2019].

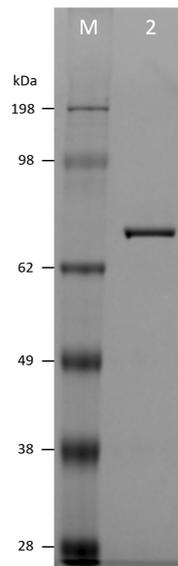


Abbildung 5.25: SDS-PAGE peqGold Taq DNA Polymerase

Probenreihenfolge v. l. n. r.: Marker [M], peqGold Taq DNA Polymerase [2]; SDS-PAGE: 10 % Acrylamid ohne SDS; Laufpuffer: Rotiphorese SDS Page; Laufbedingungen 250 V, 40 min; Marker: SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard; Färbelösung: Roti[®]-Blue quick ready-to-use 1x Lösung.

In Abbildung 5.25 wird deutlich, dass die peqGold Taq DNA Polymerase bei ca. 75 kDa eine Bande aufweist. Somit läuft auch bei der gekauften peqGold Taq Polymerase die Bande niedriger.

Des Weiteren wurde als direkter Größenvergleich die kommerziell hergestellte Hemo KlenTaq[®] DNA Polymerase (NEB) mit der exprimierten KlenTaq und der peqGold Taq DNA Polymerase auf eine SDS-PAGE geladen.

Die Hemo KlenTaq[®] DNA Polymerase wurde zunächst 1:5 verdünnt und von dieser Verdünnung 10 μ l, 5 μ l und 2,5 μ l mit der äquivalenten Menge Probenpuffer gemischt. Bevor die SDS-PAGE beladen wurde, wurde das Volumen mit 1:2 verdünntem Probenpuffer auf 20 μ l aufgefüllt und die 20 μ l auf die SDS-PAGE geladen.

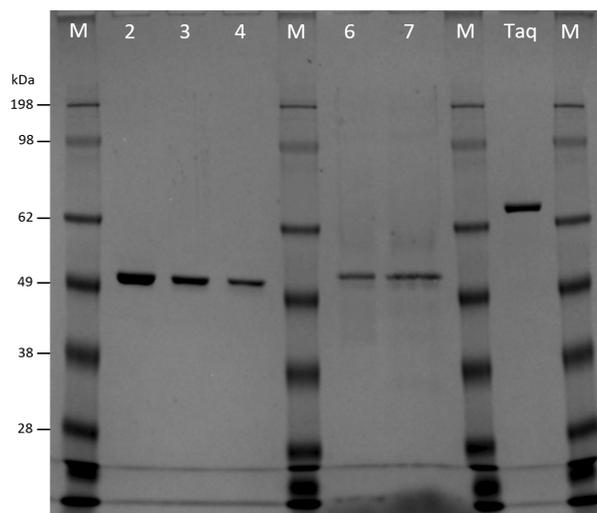


Abbildung 5.26: SDS-PAGE Hemo KlenTaq[®], exprimierte KlenTaq und peqGold Taq DNA Polymerase

Probenreihenfolge v. l. n. r.: Marker [M], Hemo KlenTaq[®] DNA Polymerase 10 μ l [2], Hemo KlenTaq[®] DNA Polymerase 5 μ l [3], Hemo KlenTaq[®] DNA Polymerase 2,5 μ l [4], Marker [M], exprimierte KlenTaq DNA Polymerase in Glycerin [6], exprimierte KlenTaq DNA Polymerase ohne Glycerin [7], Marker [M], peqGold Taq DNA Polymerase [Taq], Marker [M]; SDS-PAGE: 10 % Acrylamid ohne SDS; Laufpuffer: Rotiphorese SDS Page; Laufbedingungen 250 V, 40 min; Marker: SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard; Färbelösung: Roti[®]-Blue quick ready-to-use 1x Lösung.

In Abbildung 5.26 wird deutlich, dass die gekaufte Hemo KlenTaq[®] DNA Polymerase (*lane* 2, 3 und 4) und die in *P. pastoris* exprimierte KlenTaq DNA Polymerase (*lane* 6 und 7) ungefähr auf gleicher Höhe laufen. Die Banden der beiden DNA Polymerasen laufen auf einer Größe von ca. 52 kDa und somit etwa 10 kDa unter dem theoretischen Wert von 62 kDa. Auch die Bande der peqGold Taq DNA Polymerase läuft erneut niedriger als der theoretische Wert.

5.11 Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Wie in Abschnitt 4.9.2 beschrieben, wurde versucht die KlenTaq DNA Polymerase durch den N-terminalen His6-tag mittels SERVA Ni-NTA *magnetic beads* aufzureinigen. Hier wurde sich zunächst nach den Vorgaben des Herstellers (SERVA Electrophoresis GmbH) gerichtet. Dieser gibt an, dass das benötigte Volumen der SERVA Ni-NTA *magnetic beads* Suspension von der Expressionsrate des His-tag-Proteins abhängig ist. Da die Expressionsrate der KlenTaq DNA Polymerase jedoch unbekannt war, wurde zunächst ein frei gewähltes Volumen an Beads-Suspension (50 μl) verwendet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Dieses wurde für eine Minute in einen Magnetständer gestellt um die *beads* im Reaktionsgefäß zu fixieren. Der Überstand wurde abgenommen und zur Äquilibrierung der *beads* 125 μl Bindungspuffer zugegeben. Die *beads* und Bindungspuffer wurden gemischt bis eine homogene Suspension vorlag und dann das Reaktionsgefäß erneut für eine Minute in den Magnetständer gestellt und der Überstand abgenommen. Für die folgende Probenaufgabe wurde 1 ml Probe aufgegeben und für 30 min vorsichtig auf einem Rotationsmischer gemischt. Anschließend wurden die *beads* mit gebundener His6-tag KlenTaq DNA Polymerase vom Überstand separiert, indem das Reaktionsgefäß für 3 min in den Magnetständer gestellt wurde. Es folgte ein Waschen der *beads* durch Aufgeben von 125 μl Waschpuffer, das Mischen von *beads* und Waschpuffer bis eine homogene Suspension entstand und anschließend das Separieren von *beads* und Waschpuffer im Magnetständer für eine Minute. Der Überstand wurde abgenommen und der Waschschrift zweimal wiederholt. Anschließend folgte die Elution des Fusionsproteins. Dazu wurden 25 μl Elutionspuffer zu den *beads* gegeben und Elutionspuffer und *beads* für 10 min im Schüttelheizblock bei RT gemischt, sodass eine homogene Suspension entstand. Anschließend wurden *beads* und Überstand im Magnetständer separiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Elutionsfraktionen entstanden. Die Aufreinigung wurde ein weiteres Mal durchgeführt, indem die Volumina der *beads*-Suspension und Puffer erhöht wurden. Es wurden 100 μl (\cong 5 μl *beads*) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit 250 μl Bindungspuffer äquilibriert, mit 250 μl Waschpuffer gewaschen und mit 50 μl Elutionspuffer eluiert. Die grundsätzliche Durchführung wurde nicht verändert. Um den Aufreinigungserfolg zu überprüfen, wurden die Elutions-Fraktionen mit der nicht aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase auf einer SDS-PAGE verglichen (siehe Abb. 5.27).

In Abbildung 5.27 wird deutlich, dass die Bande der nicht aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase (*lane* 1) schwächer ist als die der aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 1 (*lane* 3). Die Elutionsfraktionen 2 und 3 (*lane* 4 und 5),

weisen wie erwartet keine Banden auf. Anhand der Software Image Lab von Bio-Rad wurde die Bande der nicht aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase als Referenz gesetzt und die der aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 1 mit dieser verglichen. Es ergab sich ein Aufreinigungsfaktor von ca. 2,4. Somit konnte gezeigt werden, dass die Aufreinigung zwar prinzipiell funktioniert hat und es ein Protein mit His-tag im Überstand gibt. Somit handelt es sich wahrscheinlich um die KlenTaq DNA Polymerase. Die Aufreinigung muss jedoch noch stark optimiert werden.

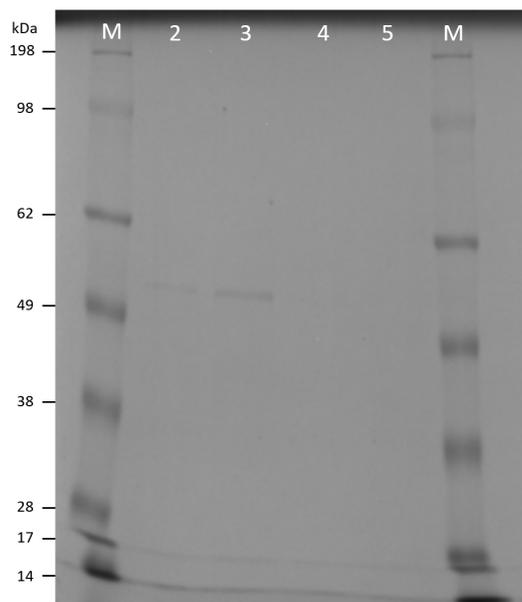


Abbildung 5.27: Vergleich der nicht aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase mit Elutionsfraktionen der *beads*-Aufreinigung

Probenreihenfolge v. l. n. r.: Marker [M], nicht aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase [2], aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 1 [3], aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 2 [4], aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 3 [5], Marker [M]; SDS-PAGE: 10 % Acrylamid ohne SDS; Laufpuffer: Rotiphorese SDS Page; Laufbedingungen 250 V, 40 min; Marker: SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard; Färbelösung: Roti®-Blue quick ready-to-use 1x Lösung.

Die sterilfiltrierte Suspension der zweiten *small-scale* Expression (KlenTaq DNA Polymerase Klon 1) wurde nach der Ernte auf zwei verschiedene Arten behandelt. Zum einen wurden 1 ml Überstand direkt mittels *beads* aufgereinigt. Zum anderen wurden 1 ml Überstand vor der Aufreinigung für 45 min bei 75 °C zur Denaturierung aufgekocht und für 45 min bei 4 °C und 16 900 xg zentrifugiert. Die Proben wurden zum Vergleich auf eine SDS-PAGE geladen. Des Weiteren wurde eine gekaufte peqGold Taq Polymerase von VWR auf die SDS-PAGE geladen um die Abweichung der Größe zu dokumentieren (siehe Abb. 5.28).

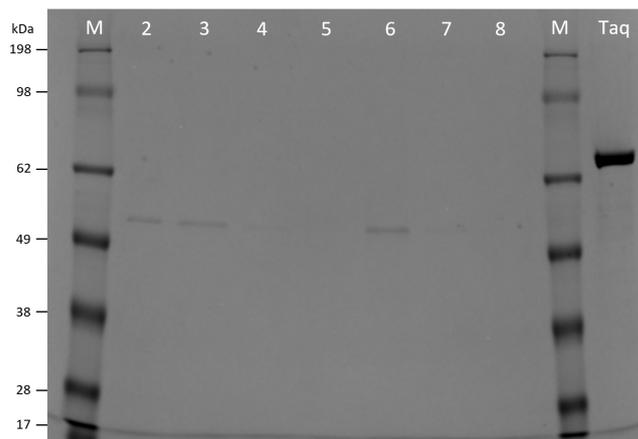


Abbildung 5.28: Vergleich der nicht aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase mit Elutionsfraktionen der *beads*-Aufreinigung mit und ohne Hitzebehandlung

Probenreihenfolge v. l. n. r.: Marker [M], nicht aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase [2], hitzebehandelte u. aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 1 [3], hitzebehandelte u. aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 2 [4], hitzebehandelte u. aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 3 [5], aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 1 [6], aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 2 [7], aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase Elutionsfraktion 3 [8], Marker [M], peqGold Taq Polymerase [Taq]; SDS-PAGE: 10% Acrylamid ohne SDS; Laufpuffer: Rotiphorese SDS Page; Laufbedingungen 250 V, 40 min; Marker: See-Blue Plus2 Pre-Stained Protein Standard; Färbelösung: Roti®-Blue quick ready-to-use 1x Lösung.

In Abbildung 5.28 wird schon durch visuelle Betrachtung deutlich, dass die Banden der hitzebehandelten und mittels *beads* aufgereinigten KlenTaq DNA Polymerase in *lane* 3 sowie die mittels *beads* aufgereinigte KlenTaq DNA Polymerase in *lane* 6 kaum stärker sind als die Bande der unbehandelten KlenTaq DNA Polymerase in *lane* 2. Auch die Auswertung mit Image Lab ergab, dass die Aufreinigung nicht reproduziert werden konnte.

Diese Ergebnisse sollten jedoch nicht zu stark gewichtet werden, da die Methode der Aufreinigung anhand der SERVA Ni-NTA *magnetic beads* noch nicht etabliert ist und bei jeder Durchführung unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Die Methode muss somit noch stark optimiert werden bevor die Aufreinigungsfaktoren qualitativ beurteilt werden können.

5.12 Kontrolle des Pufferwechsels mittels SDS-PAGE

Um die KlenTaq DNA Polymerase längerfristig lagern zu können ist ein Pufferwechsel nötig, da die Polymerase-Aktivität beim Einfrieren im Überstand verloren gehen kann. Aus diesem Grund wurde ein Pufferwechsel mittels Roti®-Spin MIDI-30 Membranen

durchgeführt. Da diese Methode zuvor nicht im Labor etabliert war, wurden zwei Test-Ansätze durchgeführt. Dazu wurden je 2 ml der sterilfiltrierten KlenTaq DNA Polymerase der *small-scale* expression in das Probenreservoir, auf die Membran, gegeben und in einer Zentrifuge mit Festwinkelrotor bei 7197 xg zentrifugiert um die Probe 10-fach aufzukonzentrieren. Danach wurde diese wieder 10-fach mit dem Lagerungspuffer verdünnt und durch Zentrifugation erneut aufkonzentriert. Der Vorgang wurde 4 mal wiederholt. Die Zentrifugationsschritte wurden jeweils für 20-40 min durchgeführt. Abschließend wurden 100 µl des Konzentrats abgenommen und mit 100 µl Glycerin gemischt. Nun kann die KlenTaq DNA Polymerase für eine Kurzzeitlagerung bei 4 °C oder zur Langzeitlagerung bei -20 °C gelagert werden. Um zu kontrollieren, dass die KlenTaq DNA Polymerase während des Pufferwechsels nicht verloren gegangen ist, wurden die ungepufferten Proben auf eine SDS-PAGE geladen. Zusätzlich wurde die gekaufte peqGold Taq DNA Polymerase von VWR auf die SDS-PAGE geladen.

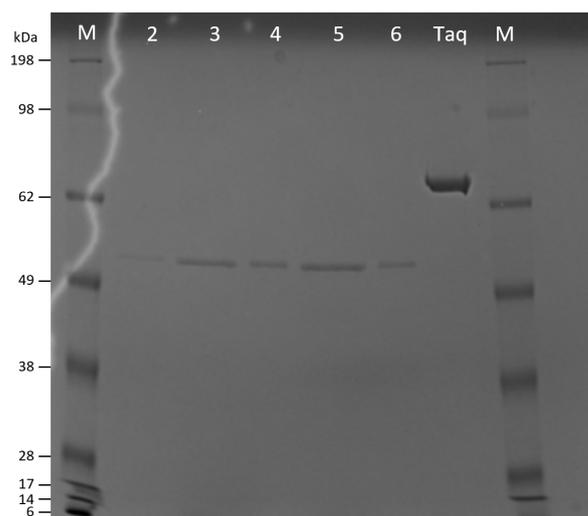


Abbildung 5.29: Vergleich der KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer mit und ohne Glycerin, sowie mit der KlenTaq DNA Polymerase im Überstand

Probenreihenfolge v. l. n. r.: Marker [M], KlenTaq DNA Polymerase im Überstand [2], KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer ohne Glycerin (Ansatz 1) [3], KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer mit Glycerin (Ansatz 1) [4], KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer ohne Glycerin (Ansatz 2) [5], KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer mit Glycerin (Ansatz 2) [6], peqGold Taq Polymerase [Taq], Marker [M]; SDS-PAGE: 10 % Acrylamid ohne SDS; Laufpuffer: Rotiphorese SDS Page; Laufbedingungen 250 V, 40 min; Marker: SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard; Färbelösung: Roti[®]-Blue quick ready-to-use 1x Lösung.

In Abbildung 5.29 wird deutlich, dass die Banden der *lanes* 3-6 (KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer) deutlich stärker sind, als die der KlenTaq DNA

Polymerase im Überstand (*lane 2*). Mittels Image Lab wurde die relative Quantität der umgepufferten Proben im Vergleich zur KlenTaq DNA Polymerase im Überstand berechnet. Für den Ansatz 1 ergab sich für die KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer ohne Glycerin ein Faktor von 5,5 und für die KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer mit Glycerin ein Faktor von 3,0. Für den Ansatz 2 ergab sich für die KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer ohne Glycerin ein Faktor von 7,6 und für die KlenTaq DNA Polymerase im Lagerungspuffer mit Glycerin ein Faktor von 2,5. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Aufkonzentrierung mittels Roti[®]-Spin MIDI-30 Membranen effektiver ist, als mit der nicht-optimierten *beads*-Aufreinigung.

5.13 Funktionale Analyse der KlenTaq DNA Polymerase

Um das exprimierte Protein auf DNA-Polymeraseaktivität zu überprüfen und somit nachzuweisen, dass es sich um die KenTaq handelt, wurde eine Check-PCR durchgeführt. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 4.11 und die Zusammensetzung der Mastermixe (MM) in Tab. 4.6 gelistet. Als Positiv-Kontrolle wurde als Template das Plasmid pBSY2H4 (1 ng/ μ l) zugegeben und als Negativ-Kontrolle diente ddH₂O. Des Weiteren wurde in einem Mastermix statt der KlenTaq DNA Polymerase die Hemo[®] KlenTaq DNA Polymerase (NEB) zupipettiert. Nach abgeschlossener PCR wurden die Proben mit dem peqGOLD Microspin Cycle Pure Kit (VWR) Aufreinigungs-kit aufgereinigt und anschließend auf ein 2%iges Agarosegel geladen und der Lauf bei 120 V für 40 min gestartet.

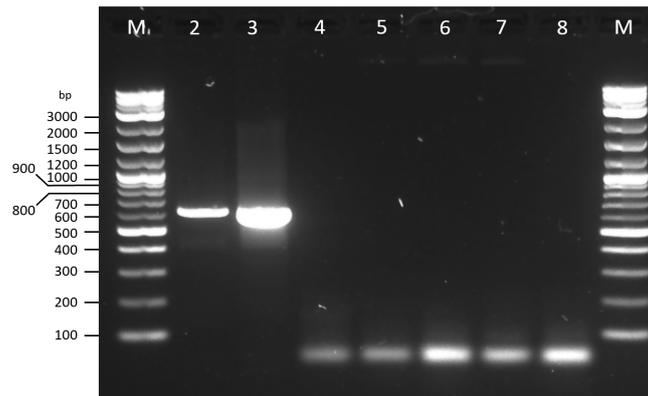


Abbildung 5.30: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte pB-SY2H4 mit Primer 16 und 17 zur Überprüfung der Funktionalität der KlenTaq DNA Polymerase

Probenreihenfolge v. l. n. r.: DNA-Ladder [M], 1 μ l Hemo KlenTaq mit Plasmid [2], 5 μ l KlenTaq mit Plasmid [3], 5 μ l KlenTaq mit H₂O [4], 5 μ l KlenTaq mit Plasmid [5], 10 μ l KlenTaq mit Plasmid [6], 10 μ l KlenTaq (10-fach) mit Plasmid [7], 10 μ l KlenTaq mit H₂O [8], DNA-Ladder [M];

Gellauf: 2 % Agarose, TAE-Laufpuffer, Färbung mit SYBR-Safe, Spannung 120 V, Laufzeit 40 min.

Auf dem Agarosegel wurde deutlich, dass für die Proben, welche vermutlich die KlenTaq DNA Polymerase enthielten, kein PCR-Produkt gebildet wurde. Die dort sichtbaren Banden sind durch Primerdimere entstanden. Die Kontrollansätze mit der gekauften Hemo[®] KlenTaq DNA Polymerase in *lane* 2 und 3 wiesen eine Bande auf erwarteter Höhe auf.

6 Diskussion

6.1 Klonierung

Zunächst sollte der Expressionvektor pBSY2H4_KlenTaq mittels GG Klonierung produziert werden. Für die Klonierungsreaktion war es zunächst nötig, das Plasmid pBSY2H4 aus *E. coli* JM109 zu isolieren. Die Plasmid-Isolierung wurde erfolgreich durchgeführt und mittels Check-PCR überprüft. Durch Bestimmung der Anzahl an Plasmiden/Zellen konnte bewiesen werden, dass es sich beim pBSY2H4 um ein *high-copy* Plasmid handelt. Auch die GG Klonierung konnte erfolgreich durchgeführt werden. Der GG-Ansatz bestand jedoch aus einem Gemisch aus Expressionsvektor pBSY2H4_KlenTaq und Donationsvektor pBSY2H4. Es gibt mehrere Einflussfaktoren um die Effizienz der GG Reaktion zu steigern. So können z. B. das Verhältnis von Klonierungs- und Donationsvektor, die Zyklenanzahl, die Inaktivierungszeit sowie Inaktivierungstemperatur, oder Zugabe von frischer Ligase die Genauigkeit verbessern und das Gleichgewicht weiter auf die Seite des Expressionsvektors schieben [Engler u. a., 2008; Kucera und Cantor, 2018].

Anschließend wurde *E. coli* 5-alpha mittels Elektroporation durch den Expressionsvektor transformiert und eine Erfolgskontrolle von fünf Einzelkolonien (Klonen) mittels Check-PCR und Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zusätzlich wurden die Klone auf Agarplatten mit Antibiotika (Amp bzw. Kan) als Selektionszusatz ausgestrichen. Bei der elektrophoretischen Auftrennung war bei drei der fünf untersuchten Klone eine für das Produkt spezifische Bande auf dem Gel sichtbar. Ein Klon zeigte keine Bande auf und bei einem ließ sich nur eine für das Produkt spezifische Bande vermuten. Bei der Transformation durch Elektroporation können 10^5 Transformanden/ μg DNA erzielt werden; es handelt sich um die effizienteste Methode um Plasmid-DNA in *E. coli* zu transformieren [Lin-Cereghino u. a., 2005]. Um den korrekten Einbau des KlenTaq-Genkassette in das Plasmid zu bestätigen, wurde das Plasmid zunächst aus dem *E. coli*-Stamm isoliert und Teilsequenzen zur Sequenzierung geschickt.

6.2 Rekombinante Expression

Die Integration des Expressionsvektors pBSY2H4_KlenTaq in das *P. pastoris* Wirtsgenom erfolgte durch homologe Rekombination.

Hierfür ist vor der Transformation eine Linearisierung des Vektors notwendig, da *P. pastoris* nur lineare DNA ins Genom integrieren kann.

Durch die Wahl der Linearisierungsschnittstelle kann der Ort der Rekombination gewählt werden [Reinhard und Krettler, 2012].

In dieser Arbeit wurde die *PmeI*-Schnittstelle gewählt und so das Gen des Zielproteins unter Kontrolle des starken, induzierbaren AOX1-Promotors gestellt.

Bei dem Wirtsstamm handelte es sich um den His-Auxotrophen *P. pastoris* Stamm, sodass die *P. pastoris*-Transformanten mit integriertem Expressionsvektor via His-Auxotrophie selektiert werden konnten. Vorteilhaft an der Auxotrophie-Selektion ist, dass im Gegensatz zur üblichen Zeocin-Selektion keine Antibiotika notwendig sind, welche toxisch sind und sich negativ auf den Organismus auswirken könnten [Ulfstedt u. a., 2017].

Die Erzeugung der Transformanten via Auxotrophie-System verlief prinzipiell erfolgreich, wobei hierbei jedoch Sequenz-Unstimmigkeiten aufgefallen sind. Die genomische Sequenz des *P. pastoris* BSY12MS weist Unterschiede im Vergleich zur genomischen Referenzsequenz des *P. pastoris* BSYBG11 auf und auch das Plasmid pBSY2H4 entspricht nicht zu 100% den Sequenzangaben der Firma bisy, Hofstätten/Raab. Hierzu sollten weitere Untersuchungen und Sequenzanalysen durchgeführt werden. Mittels *small-scale* Expression wurde ein Protein extrazellulär produziert. Es wurde unter Abwesenheit von Glucose mit Methanol als C-Quelle induziert, wodurch es zur Transkription des Zielgens kommt, welches unter der Kontrolle des AOX1-Promotors steht.

Die Sekretion des Proteins in das Medium erfolgte hierbei über die pre-pro Sequenz. Die pre-pro- α -Faktor Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte genutzt werden, um heterologe Proteine ins Medium zu sekretieren [Zsebo u. a., 1986]. Auch in *P. pastoris* ist die Nutzung der pre-pro Sequenz zur Sekretion von Proteinen die erfolgreichste und meist verbreitetste Methode [Chahal u. a., 2017]. Die KlenTaq DNA Polymerase besitzt einen N-terminalen His-tag, über welchen eine Aufreinigung mittels *magnetic beads* durchgeführt werden sollte. Die Ni-Affinitätschromatographie hat in einem Versuchsdurchlauf funktioniert und es konnte im Überstand ein Protein mit His-tag nachgewiesen werden. Die Ergebnisse konnten jedoch nicht reproduziert werden, weshalb diese Methode weiter optimiert werden sollte.

Bei dem aufgereinigten Protein handelt es sich um die gewünschte KlenTaq DNA Polymerase. Ein Vergleich der rekombinant exprimierten KlenTaq DNA Polymerase

zur gekauften Hemo KlenTaq[®] DNA Polymerase zeigte, dass beide DNA Polymerasen in der SDS-PAGE etwa auf gleicher Höhe liefen.

Durch Analyse der exprimierten KlenTaq DNA Polymerase auf DNA-Polymeraseaktivität konnte keine Funktionalität nachgewiesen werden. Die Konzentration der eingesetzten KlenTaq DNA Polymerase könnte zu gering gewesen, oder die DNA-Polymeraseaktivität z. B. durch falsche Lagerung verloren gegangen sein. In weiteren Arbeiten sollte daran geforscht werden, die DNA-Polymeraseaktivität nachzuweisen.

6.3 Fazit und Ausblick

Die Klonierung und rekombinante Expression der KlenTaq DNA Polymerase in *P. pastoris* konnte in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt werden.

Das Gen, welches für die KlenTaq DNA Polymerase codiert, stammt ursprünglich aus *Thermophilus aquaticus* und wurde für die Translation in *P. pastoris* codon-optimiert um optimale Ergebnisse zu erzielen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich die Primärsequenz nicht verändert und dass keine *SapI* Schnittstellen im GOI vorhanden sind.

Die homologe Rekombination des Expressionsvektors erfolgte innerhalb der pAOX1-Sequenz in *P. pastoris*, um die Transkription der KlenTaq DNA Polymerase durch Methanol-Induktion zu regulieren. Die Kultivierung der KlenTaq DNA Polymerase mittels *small-scale* Expression verlief erfolgreich und das Zielprotein wurde durch die pre-pro Sequenz ins Medium sekretiert. Die Expression von DNA Polymerasen mit *P. pastoris* ist in der Literatur wenig beschrieben.

Am meisten verbreitet ist die Expression von DNA Polymerasen in *E. coli*, obwohl das Expressionslevel hier deutlich geringer ist und aufwendige Aufreinigungsschritte notwendig sind, wodurch eine schnelle Produktion einer großen Menge verhindert wird. Die erste Publikation einer erfolgreichen Expression einer DNA Polymerase erfolgte 2015. Hier erfolgte die Expression und Charakterisierung der RKOD DNA Polymerase in *P. pastoris*. Als Vorteile, *P. pastoris* als Expressionsstamm zu nutzen, werden der AOX1-Promotor, ein hohes Expressionslevel, sowie einfache Aufreinigung genannt [Wang u. a., 2015].

In dieser Arbeit konnte die Aufreinigung des Zielproteins mittels *magnetic beads* über den N-terminalen His-tag nicht erfolgreich reproduziert werden, weshalb in weiterführenden Arbeiten dieser Arbeitsschritt optimiert werden sollte, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Hierfür wäre es z. B. sinnvoll, die Expressionsrate zu bestimmen um das nötige Volumen der *beads*-Suspension ermitteln zu können und die Ausbeute zu erhöhen.

Der Funktionalitätsnachweis war nicht erfolgreich. In weiterführenden Arbeiten sollte daran gearbeitet werden die DNA-Polymeraseaktivität nachzuweisen und evtl. eine *Real-Time* PCR durchgeführt werden.

Nach erfolgreichem Funktionalitätsnachweis könnte eine Fedbatch-Kultivierung in größerem Maßstab entwickelt werden und die Produktion der KlenTaq DNA Polymerase in großen Mengen im Fermenter mit geeigneten Fermentationsbedingungen durchgeführt werden. Anschließend bietet es sich an, das Zielprodukt weiter chromatographisch aufzureinigen.

Literaturverzeichnis

- [Allen u. a. 1989] ALLEN, Dwayne J. ; DARKE, Paul L. ; BENKOVIC, Stephen J.: Fluorescent oligonucleotides and deoxynucleotide triphosphates: preparation and their interaction with the large (Klenow) fragment of Escherichia coli DNA polymerase I. In: *Biochemistry* 28 (1989), Nr. 11, S. 4601 4607
- [Barnes 1992] BARNES, Wayne M.: The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. In: *Gene* 112 (1992), Nr. 1, S. 29 35
- [Barnes 1995] BARNES, Wayne M.: Thermostable DNA polymerase with enhanced thermostability and enhanced length and efficiency of primer extension. Google Patents. 1995. U.S. Patent No. 5,436,149
- [Barrero u. a. 2018] BARRERO, Juan J. ; CASLER, Jason C. ; VALERO, Francisco ; FERRER, Pau ; GLICK, Benjamin S.: An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from Pichia pastoris. In: *Microbial Cell Factories* 17 (2018), Nr. 161
- [Braithwaite und Ito 1993] BRAITHWAITE, Dan K. ; ITO, Junetsu: Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. In: *Nucleic Acids Research* 21 (1993), Nr. 4, S. 787 802
- [Camps 2010] CAMPS, Manel: Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. In: *Recent patents on DNA & gene sequences* 4 (2010), S. 58 73
- [Cereghino u. a. 2002] CEREGHINO, Geoff P. L. ; CEREGHINO, Joan L. ; ILGEN, Christine ; CREGG, James M.: Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2002), Nr. 4, S. 329 332
- [Cereghino und Cregg 2000] CEREGHINO, Joan L. ; CREGG, James M.: Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. In: *FEMS Microbiology Reviews* 24 (2000), Nr. 1, S. 45 66
- [Chahal u. a. 2017] CHAHAL, Sabreen ; WEI, Peter ; MOUA, Pachai ; PARK, Sung P. J. ; KWON, Janet ; PATEL, Arth ; VU, Anthony T. ; CATOLICO, Jason A. ; TSAI, Yu F. T. ; SHAHEEN, Nadia ; CHU, Tiffany T. ; TAM, Vivian ; KHAN, Zill E. H. ; JOO, Hyun H. ; XUE, Liang ; LIN-CEREGHINO, Joan ; TSAI, Jerry W. ; LIN-CEREGHINO, Geoff P.: Structural characterization of the α -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in Pichia pastoris. In: *Gene* 598 (2017), S. 50 62
- [Cregg u. a. 2000] CREGG, James M. ; CEREGHINO, Joan L. ; SHI, Jianying ; HIGGINS, David R.: Recombinant protein expression in Pichia pastoris. In: *Molecular Biotechnology* 16 (2000), Nr. 1, S. 23 52
- [Dabrowski und Kur 1998] DABROWSKI, Slawomir ; KUR, Józef: Recombinant His-tagged DNA Polymerase. II. Cloning and purification of Thermus aquaticus

- recombinant DNA polymerase (Stoffel fragment). In: *Acta Biochimica Polonica* 45 (1998), Nr. 3, S. 661 667
- [Dechert 2012] DECHERT, Ute: Gelelektrophoresen. In: JANSOHN, M. (Hrsg.) ; ROTHHÄMEL, S. (Hrsg.): *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2012, S. 37 93
- [Doulah 1977] DOULAH, M. S.: Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. In: *Biotechnology and Bioengineering* 19 (1977), Nr. 5, S. 649 660
- [Drum u. a. 2014] DRUM, Matthias ; KRANASTER, Ramon ; EWALD, Christina ; BLASCZYK, Rainer ; MARX, Andreas: Variants of a *Thermus aquaticus* DNA Polymerase with Increased Selectivity for Applications in Allele- and Methylation-Specific Amplification. In: *PLoS One* 9 (2014), Nr. 5
- [Engler u. a. 2008] ENGLER, Carola ; KANDZIA, Romy ; MARILLONNET, Sylvestre: A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. In: *PLoS ONE* 3 (2008), Nr. 11, S. e3647
- [Eom u. a. 1996] EOM, Soo H. ; WANG, Jimin ; STEITZ, Thomas A.: Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. In: *Nature* 382 (1996), Nr. 6588, S. 278 281
- [Goetz 2019] GOETZ, Daniel: Klonierung und rekombinante Expression von eGFP in *Pichia pastoris*. B.Sc. Thesis. 2019. HAW Hamburg
- [Gonçalves u. a. 2013] GONÇALVES, A. M. ; PEDRO, A. Q. ; MAIA, C. ; SOUSA, F. ; QUEIROZ, J. A. ; PASSARINHA, L. A.: *Pichia pastoris*: a recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins. In: *J Microbiol Biotechnol* 23 (2013), Nr. 5, S. 587 601
- [Hartner und Glieder 2006] HARTNER, Franz S. ; GLIEDER, Anton: Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. In: *Microbial Cell Factories* 5 (2006), Nr. 39
- [Inan u. a. 2007] INAN, Mehmet ; FANDERS, Sarah A. ; ZHANG, Wenhui ; HOTEZ, Peter J. ; ZHAN, Bin ; MEAGHER, Michael M.: Saturation of the Secretory Pathway by Overexpression of a Hookworm (*Necator americanus*) Protein (Na-ASP1). In: CREGG, J. M. (Hrsg.): *Pichia Protocols. Methods in Molecular Biology* Bd. 389. Humana Press, 2007, S. 65 75
- [Innis u. a. 1988] INNIS, Michael A. ; MYAMBO, Kenneth B. ; GELFAND, David H. ; BROW, M. A.: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (1988), Nr. 24, S. 9436 9440
- [Kim u. a. 1995] KIM, Youngsoo ; EOM, Soo H. ; WANG, Jimin ; LEE, Dae-Sil ; SUH, Se W. ; STEITZ, Thomas A.: Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. In: *Nature* 376 (1995), Nr. 6541, S. 612 616

- [van der Klei u. a. 2006] KLEI, Ida J. van der ; YURIMOTO, Hiroya ; SAKAI, Yasuyoshi ; VEENHUIS, Marten: The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763 (2006), Nr. 12, S. 1453 1462
- [Korolev u. a. 1995] KOROLEV, Sergey ; NAYAL, Murad ; BARNES, Wayne M. ; DI CERA, Enrico ; WAKSMAN, Gabriel: Crystal structure of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I at 2.5-Å resolution: Structural basis for thermostability. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1995), Nr. 20, S. 9264 9268
- [Kucera und Cantor 2018] KUCERA, R. ; CANTOR, E.: Breaking through the Limitations of Golden Gate Assembly The Co-Evolution of Test Systems, Engineered Enzymes and Understanding Ligase Fidelity / New England BioLabs, Inc. URL https://www.neb.com/-/media/nebus/campaign/golden-gate/breakingthroughlimitsgoldengate_tn.pdf?la=en&rev=c06646e807474e269d8deabff9331c1d, 2018. Forschungsbericht. (abgerufen am: 27.12.19)
- [Larsen u. a. 2013] LARSEN, Sasha ; WEAVER, Jun ; SA CAMPOS, Katherine de ; BULAHAN, Rhobe ; NGUYEN, Jackson ; GROVE, Heather ; HUANG, Amy ; LOW, Lauren ; TRAN, Namphuong ; GOMEZ, Seth ; YAU, Jennifer ; ILLUSTRISIMO, Thomas ; KAWILARANG, Jessica ; LAU, Jonathan ; TRANPHUNG, Maivi ; CHEN, Irene ; TRAN, Christina ; FOX, Marcia ; LIN-CEREGHINO, Joan ; LIN-CEREGHINO, Geoff P.: Mutant strains of *Pichia pastoris* with enhanced secretion of recombinant proteins. In: *Biotechnology letters* 35 (2013), Nr. 11, S. 1925 1935
- [Lawyer u. a. 1993] LAWYER, F. C. ; STOFFEL, S. ; SAIKI, R. K. ; CHANG, S.-Y. ; LANDRE, P. A. ; ABRAMSON, R. D. ; GELFAND, D. H.: High-level Expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. In: *Genome research* 2 (1993), Nr. 4, S. 275 287
- [Lee u. a. 2012a] LEE, Pei Y. ; COSTUMBRADO, John ; HSU, Chih-Yuan ; KIM, Yong H.: Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. In: *Journal of visualized experiments* 62 (2012), Nr. 3923
- [Lee u. a. 2012b] LEE, SangYup ; MATTANOVICH, Diethard ; VILLAVERDE, Antonio: Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories. 11 (2012), Nr. 156
- [Lin-Cereghino u. a. 2005] LIN-CEREGHINO, Joan ; WONG, William W. ; XIONG, See ; GIANG, William ; LUONG, Linda T. ; VU, Jane ; JOHNSON, Sabrina D. ; LIN-CEREGHINO, Geoff P.: Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. 38 (2005), Nr. 1, S. 44 48
- [Macauley-Patrick u. a. 2005] MACAULEY-PATRICK, Sue ; FAZENDA, Mariana L. ; MCNEIL, Brian ; HARVEY, Linda M.: Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. In: *Yeast* 22 (2005), Nr. 4, S. 249 270

- [Matthies 2003] MATTHIES, Claudia: Erzeugung von Taq-DNA-Polymerasemutanten und Untersuchung ihrer Substratspezifität mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Hamburg, Universität Hamburg, Dissertation, 2003
- [Mayer 1995] MAYER, Matthias P.: A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. In: *Gene* 163 (1995), Nr. 1, S. 41 46
- [Morton und Potter 2000] MORTON, Christopher L. ; POTTER, Philip M.: Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression. In: *Molecular Biotechnology* 16 (2000), Nr. 3, S. 193 202
- [Myers u. a. 2013] MYERS, John A. ; CURTIS, Brandon S. ; CURTIS, Wayne R.: Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. In: *BMC Biophysics* 6 (2013), Nr. 4
- [Olson und Morrow 2012] OLSON, Nathan D. ; MORROW, Jayne B.: DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. In: *BMC Research Notes* 5 (2012), Nr. 688
- [Reinhard und Krettler 2012] REINHARD, Christoph ; KRETTLER, Christoph: Das *Pichia pastoris*-Expressionssystem. In: JANSOHN, M. (Hrsg.) ; ROTHHÄMEL, S. (Hrsg.): *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2012, S. 431 453
- [Schiffel 2018a] SCHIFFEL, Florian: Agarosegelelektrophorese. ROP LP07 Version: 01. Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg: , 2018
- [Schiffel 2018b] SCHIFFEL, Florian: Golden Gate Klonierung. ROP LP06 Version: 02. Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg: , 2018
- [Schiffel 2018c] SCHIFFEL, Florian: Herstellung elektrokompetenter *E. coli* (kleine Mengen). ROP LP02 Version: 02. Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg: , 2018
- [Schiffel 2018d] SCHIFFEL, Florian: Herstellung elektrokompetenter *Pichia pastoris*. ROP LP16 Version: 01. Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg: , 2018
- [Schiffel 2018e] SCHIFFEL, Florian: Polymerase-Kettenreaktion (PCR). ROP LP09 Version: 02. Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg: , 2018
- [Schiffel 2018f] SCHIFFEL, Florian: Protein-Expression mit *Pichia Pastoris*. ROP LP19 Version: 01. Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg: , 2018
- [Schiffel 2018g] SCHIFFEL, Florian: SDS-PAGE. ROP LP08 Version: 02. Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg: , 2018
- [Schiffel 2018h] SCHIFFEL, Florian: Transformation von *E. coli*. ROP LP04 Version: 02. Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg: , 2018

- [Schiffel 2018i] SCHIFFEL, Florian: Transformation von *P. pastoris*. ROP LP18 Version: 01. Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg: , 2018
- [Ulfstedt u. a. 2017] ULFSTEDT, Mikael ; HU, Guo-Zhen ; JOHANSSON, Monika ; RONNE, Hans: Testing of Auxotrophic Selection Markers for Use in the Moss *Physcomitrella* Provides New Insights into the Mechanisms of Targeted Recombination. In: *Frontiers in Plant Science* 8 (2017), Nr. 1850
- [Villbrandt u. a. 2000] VILLBRANDT, B. ; SOBEK, H. ; FREY, B. ; SCHOMBURG, D.: Domain exchange: chimeras of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Escherichia coli* DNA polymerase I and *Thermotoga neapolitana* DNA polymerase. In: *Protein Engineering, Design and Selection* 13 (2000), Nr. 9, S. 645 654
- [Vingataramin und Frost 2015] VINGATARAMIN, Laurie ; FROST, Eric H.: A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. In: *BioTechniques* 58 (2015), Nr. 3
- [Vorhoff 2019] VORHOFF, Thomas: peqGold Taq-DNA-Polymerase. Email-Auskunft. 2. Dezember 2019
- [Wang u. a. 2015] WANG, Fei ; LI, Shuntang ; ZHAO, Hui ; BIAN, Lu ; CHEN, Liang ; ZHANG, Zhen ; ZHONG, Xing ; MA, Lixin ; YU, Xiaolan: Expression and Characterization of the RKOD DNA Polymerase in *Pichia pastoris*. In: *PLoS One* 10 (2015), Nr. 7, S. e0131757
- [Wink 2011] WINK, Michael: Molekulare Biotechnologie - Konzepte, Methoden und Anwendungen. 2. Weinheim : Wiley-VCH, 2011. ISBN 978-3-527-32655-6
- [Wurm 2004] WURM, Florian M.: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. In: *Nature biotechnology* 22 (2004), S. 1393 1398
- [Xu u. a. 2014] XU, Cuiling ; MAXWELL, Brian A. ; SUO, Zucui: Conformational Dynamics of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase I during Catalysis. In: *Journal of molecular biology* 426 (2014), Nr. 16, S. 2901 2917
- [Zsebo u. a. 1986] ZSEBO, K. M. ; LU, H. S. ; FIESCHKO, J. C. ; GOLDSTEIN, L. ; DAVIS, J. ; DUKER, K. ; SUGGS, S. V. ; LAI, P. H. ; BITTER, G. A.: Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro-alpha-factor leader region. In: *Journal of Biological Chemistry* 261 (1986), Nr. 5, S. 5858 5865

A Anhang

A.1 Sequenzierungsergebnisse KlenTaq DNA Polymerase

A.1.1 Alignment der originalen KlenTaq DNA Polymerase und der codon-optimierten KlenTaq DNA Polymerase

```

                                                                 60
Codon-optimiert: GCTCTTCGAT GAGATTCCCA TCTATTTTCA CCGCTGTCTT GTTCGCTGCC TCCTCTGCAT
                  ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
Original:        GCTCTTCGAT GAGATTCCCA TCTATTTTCA CCGCTGTCTT GTTCGCTGCC TCCTCTGCAT

                                                                 120
Codon-optimiert: TGGCTGCCCC TGTTAAACT ACCACTGAAG ACGAGACTGC TCAAATTCCA GCTGAAGCAG
                  ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
Original:        TGGCTGCCCC TGTTAAACT ACCACTGAAG ACGAGACTGC TCAAATTCCA GCTGAAGCAG

                                                                 180
Codon-optimiert: TTATCGGTTA CTCTGACCTT GAGGGTGATT TCGACGTCGC TGTTTTGCCCT TTCTCTAACT
                  ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
Original:        TTATCGGTTA CTCTGACCTT GAGGGTGATT TCGACGTCGC TGTTTTGCCCT TTCTCTAACT

                                                                 240
Codon-optimiert: CCACTAACAA CGGTTTGTG TTCATTAACA CCACTATCGC TTCCATTGCT GCTAAGGAAG
                  ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
Original:        CCACTAACAA CGGTTTGTG TTCATTAACA CCACTATCGC TTCCATTGCT GCTAAGGAAG

                                                                 300
Codon-optimiert: AGGGTGTCTC TCTCGAGAAG AGACATCATC ATCACCATCA CTTGCTGCAC GAGTTCGGTT
                  ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
Original:        AGGGTGTCTC TCTCGAGAAG AGACATCATC ATCACCATCA TCTCCTCCAC GAGTTCGGCC

                                                                 360
Codon-optimiert: TGCTTGAATC TCCTAAGGCT TTGGAAGAAG CTCCTTGGCC ACCACCAGAA GTTGCTTTTG
                  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        TTCTGAAAAG CCCCAAGGCC CTGGAGGAGG CCCCTTGGCC CCCGCCGAA GGGCCCTTCG

                                                                 420
Codon-optimiert: TTGGTTTCGT CCGTCCAGA AAAGAACCTA TGTGGGCTGA CTTGTTGGCT TTGGCTGCTG
                  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        TGGCTTTTGT GCTTCCCGC AAGAGGCCA TGTGGGCCGA TCTTCTGGCC CTGGCCGCCG

                                                                 480
Codon-optimiert: CTAGAGGTGG TAGAGTTCAT AGAGCACCAG AACCATACAA GGCCCTGAGA GACTTGAAAG
                  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        CCAGGGGGGG CCGGGTCCAC CGGGCCCCG AGCCTTATAA AGCCCTCAGG GACTGAAGG

                                                                 540
Codon-optimiert: AGGCTAGAGG TTGTTGGCT AAGACTTGT CCGTCTGGC TTTGAGAGAA GTTTGGGTT
                  :::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        AGGCGCGGGG GCTTCTCGCC AAAGACCTGA GCGTCTGGC CCTGAGGGAA GGCCTTGGCC

                                                                 501
Codon-optimiert: TGCCACCAGG TGATGACCCA ATGTTGTTGG CCTACTTGTT GGACCCATCC AACACTACTC
                  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        TCCC GCCCGG CGACGACCCC ATGCTCCTCG CCTACCTCCT GGACCCCTCC AACACCACCC

                                                                 600
Codon-optimiert: CAGAGGGTGT TGCTAGAAGA TACGGTGGTG AATGGACTGA AGAGGCTGGT GAAAGAGCTG
                  :::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        CCGAGGGGGT GGCCCGGGC TACGGCGGGG AGTGGACGGA GGAGGCGGGG GAGCGGGCCG
    
```

A ANHANG

```

                                651                                720
Codon-optimiert: CTTTGTCCGA AAGACTGTTC GCTAACTTGT GGGGTAGATT GGAGGGTGAA GAAAGATTGC
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        CCCTTTCCGA GAGGCTCTTC GCCAACCTGT GGGGGAGGCT TGAGGGGGAG GAGAGGCTCC

                                780
Codon-optimiert: TGTGGCTGTA CAGAGAGGTC GAAAGACCAT TGTCTGCTGT TTTGGCTCAC ATGGAAGCTA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        TTTGGCTTTA CCGGGAGGTG GAGAGGCCCC TTTCCGCTGT CCTGGCCAC  ATGGAAGCTA

                                840
Codon-optimiert: CCGGTGTTAG ATTGGACGTT GCTTACTTGA GAGCCTTGTC CTTGGAAGTT GCTGAAGAGA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        CGGGGTGCG  CCTGGACGTG GCCTATCTCA GGGCCTTGTC CCTGGAGGTG GCCGAGGAGA

                                900
Codon-optimiert: TTGCTAGATT GGAAGCCGAG GTTTTCAGAT TGGCTGGTCA CCCATTCAAC TTGAACTCCA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        TCGCCCGCCT CGAGGCCGAG GTCTTCCGCC TGGCCGGCCA CCCCTTCAAC CTCAACTCCC

                                960
Codon-optimiert: GAGATCAGTT GGAGAGAGTC CTGTTGACG AATTGGGATT GCCAGCTATC GGTAAGACTG
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        GGGACCAGCT GAAAGGGTTC CTCTTTGACG AGCTAGGGCT TCCC GCCATC GGCAAGACGG

                                1020
Codon-optimiert: AAAAGACCGG TAAGAGATCC ACTTCCGCTG CAGTTTGGGA AGCTCTGAGA GAAGCTCACC
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        AGAAGACCGG CAAGCGCTCC ACCAGCGCCG CCGTCTGGA GGCCCTCCGC GAGGCCACC

                                1080
Codon-optimiert: CAATCGTTGA GAAGATCCTG CAGTACAGAG AACTGACCAA GCTGAAGTCC ACTTACATCG
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        CCATCGTTGA GAAGATCCTG CAGTACCGGG AGCTACCAA GCTGAAGAGC ACCTACATTG

                                1140
Codon-optimiert: ATCCATTGCC AGACCTGATT CACCCAAGAA CTGGTAGATT GCACACCAGA TTCAACCAGA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        ACCCCTTGCC GGACCTCATC CACCCAGGA CGGGCCGCCT CCACACCCGC TTCAACCAGA

                                1200
Codon-optimiert: CTGCTACCGC TACTGGAAGA TTGTCCTCTT CTGACCCAAA CTTGCAGAAC ATCCCAGTCA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        CGGCCACGGC CACGGGCAGG CTAAGTAGCT CCGATCCCAA CCTCCAGAAC ATCCCCGTCC

                                1260
Codon-optimiert: GAACTCCACT GGGTCAGAGA ATTAGAAGGG CTTTCATTGC TGAGGAAGGT TGGTTGTTGG
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        GCACCCCGCT TGGGCAGAGG ATCCGCCGGG CCTTCATCGC CGAGGAGGGG TGGCTATTGG

                                1320
Codon-optimiert: TTGCCCTGGA CTA CTCTCCAG ATCGAGTTGA GAGTTTGGC CCATTGTCTT GGTGACGAGA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        TGGCCCTGGA CTATAGCCAG ATAGAGCTCA GGGTGCTGGC CCACCTCTCC GGCACGAGA

                                1380
Codon-optimiert: ACCTGATCAG AGTGTCCAA GAGGGTAGAG ACATCCACAC TGAAACTGCC TCTTGGATGT
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Original:        ACCTGATCCG GGTCTCCAG GAGGGCGGG ACATCCACAC GGAGACCGCC AGCTGGATGT

```


A ANHANG

```
Original: GTAGATACGT TCCAGACTTG GAGGCCAGAG TTAAGTCTGT TAGAGAAGCC GCTGAGAGAA 600
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P17:      GTAGATACGT TCCAGACTTG GAGGCCAGAG TTAAGTCTGT TAGAGAAGCC GCTGAGAGAA

Original: TGGCCTTCAA CATGCCAGTT CAAGGTACTG CTGCTGACTT GATGAAGTTG GCCATGGTCA 660
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P17:      TGGCCTTCAA CATGCCAGTT CAAGGTACTG CTGCTGACTT GATGAAGTTG GCCATGGTCA

Original: AGTTGTTCCC AAGGTTGGAA GAAATGGGTG CCAGAATGCT GTTGCAAGTT CACGACGAGT 720
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P17:      AGTTGTTCCC AAGGTTGGAA GAAATGGGTG CCAGAATGCT GTTGCAAGTT CACGACGAGT

Original: TGGTTTTGGA GGCCCTAAA GAAAGAGCCG AAGCTGTAGC AAGATTGGCC AAAGAAGTTA 780
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P17:      TGGTTTTGGA GGCCCTAAA GAAAGAGCCG AAGCTGTAGC AAGATTGGCC AAAGAAGTTA

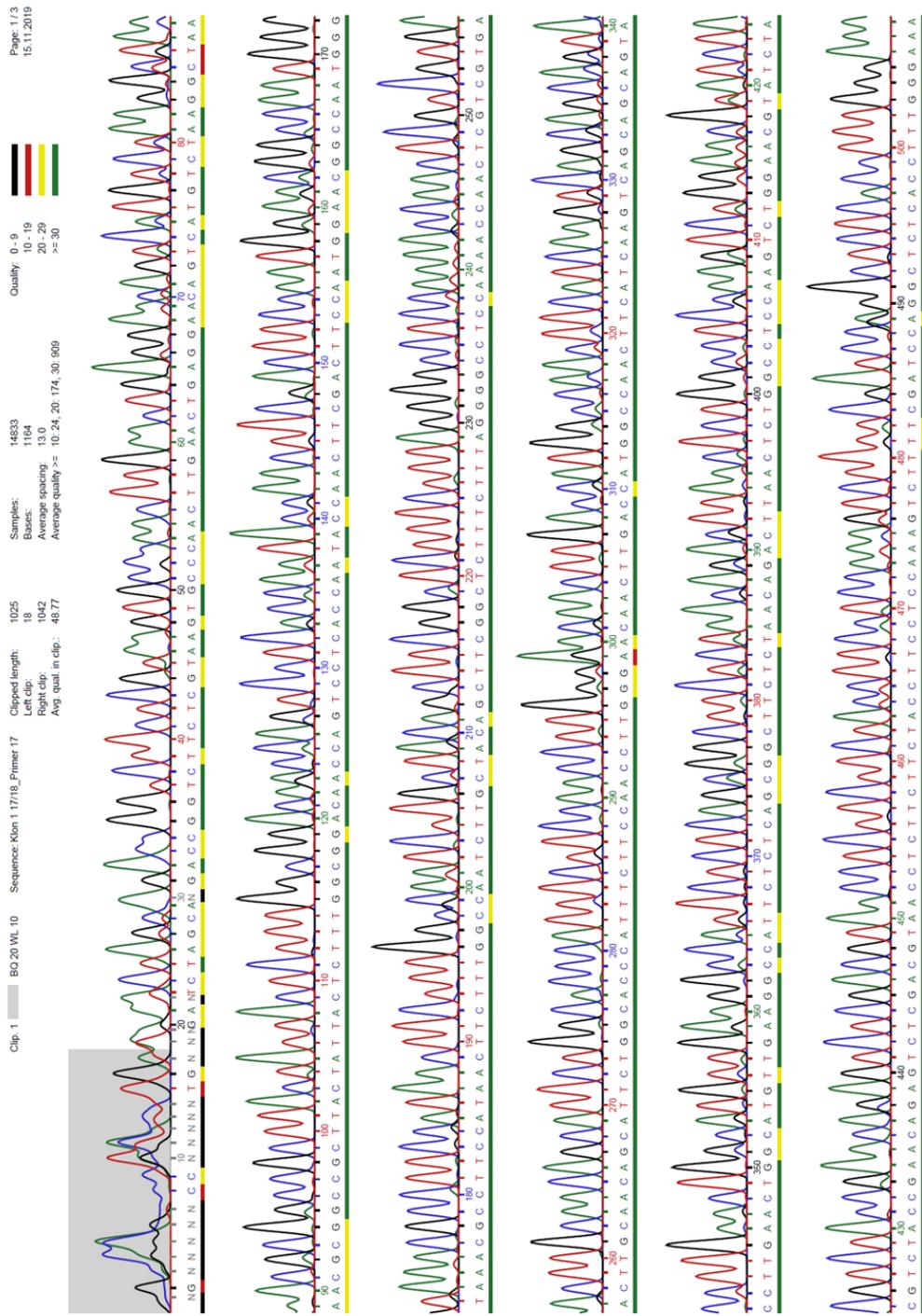
Original: TGGAAGGCGT TTACCCATTG GCCGTTCAT  TGGAAGTCGA AGTTGGTATT GGTGAGGACT 840
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P17:      TGGAAGGCGT TTACCCATTG GCCGTTCAT  TGGAAGTCGA AGTTGGTATT GGTGAGGACT

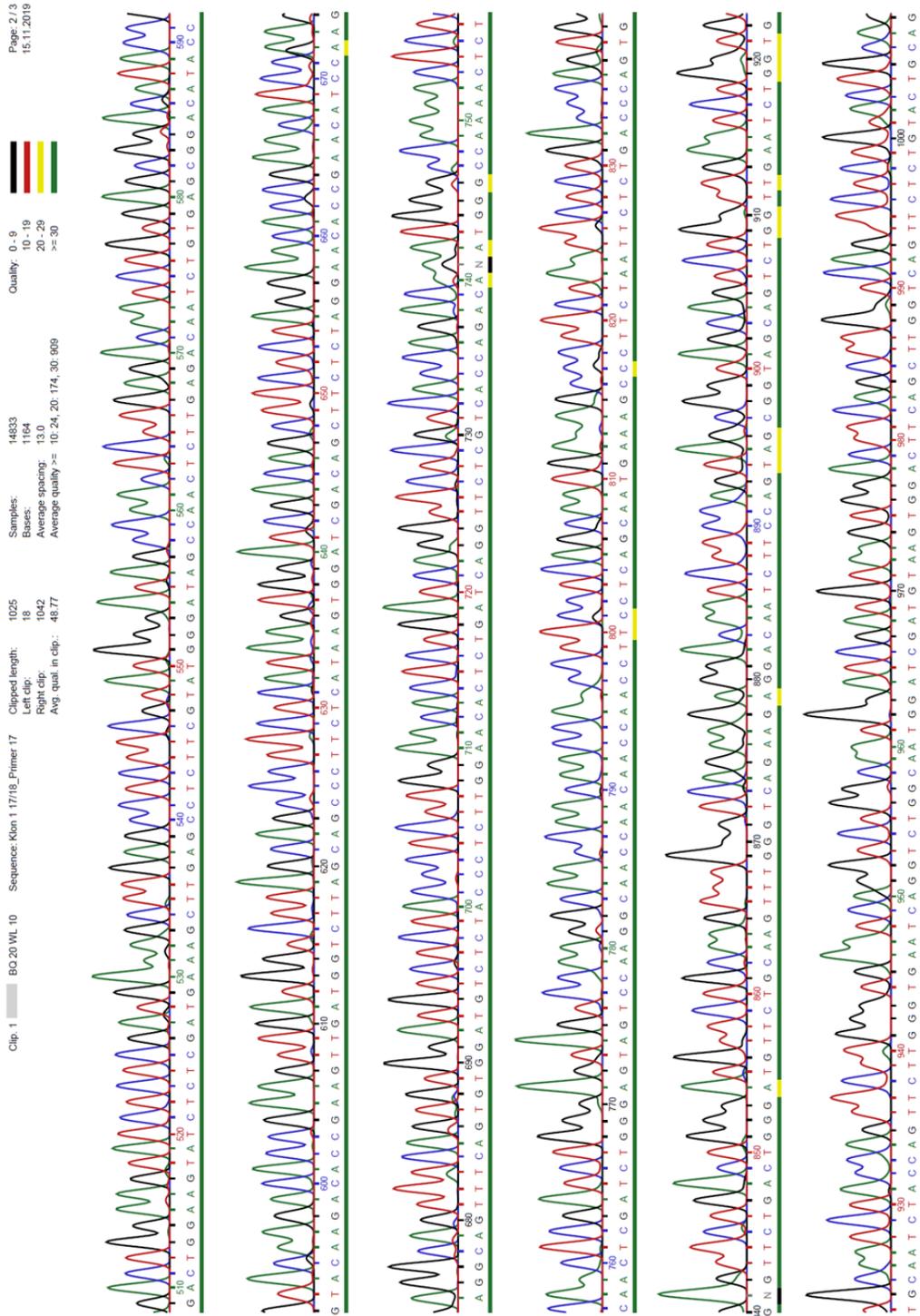
Original: GGTGTCCGC CAAAGAGTAA TAGTAAGCGG CCGC 874
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::
P17:      GGTGTCCGC CAAAGAGTAA TAGTAAGCGG CCGC
```

Abbildung A.2: Alignment der C-terminalen Gensequenz der KlenTaq DNA Polymerase (Primer 17)

Ein “:“ symbolisiert identische Basen, eine Lücke (“ ”) steht für unterschiedliche Basen.

A.1.3 Sequenzierungsreport der C-terminalen Gensequenz der KlenTaq DNA Polymerase (Primer 17)





A.2 Sequenzierungsergebnisse *P. pastoris* WT

A.2.1 Alignment der *P. pastoris* BSY12MS und *P. pastoris* BSYBG11 Gensequenzen

```

Pichia pastoris BSY12MS: TTCCAAGATT CTGGTGGGAA TACTGCTGAT AGCCTAACGT TCATGATCAA AATTTAACTG
Pichia pastoris BSYBG11: TTCCAAGATT CTGGTGGGAA TACTGCTGAT AGCCTAACGT TCATGATCAA AATTTAACTG
60

Pichia pastoris BSY12MS: TTCTAACCCC TACTTGACAG CAATATATAA ACAGAAGGAA GCTGCCCTGT CTTAAACCTT
Pichia pastoris BSYBG11: TTCTAACCCC TACTTGACAG CAATATATAA ACAGAAGGAA GCTGCCCTGT CTTAAACCTT
120

Pichia pastoris BSY12MS: TTTTTTATC ATCATTATTA GCTTACTTTC ATAATTGCGA CTGGTTCCAA TTGACAAGCT
Pichia pastoris BSYBG11: TTTTTTATC ATCATTATTA GCTTACTTTC ATAATTGCGA CTGGTTCCAA TTGACAAGCT
180

Pichia pastoris BSY12MS: TTTGATTTTA ACGACTTTTA ACGACAACCT GAGAAGATCA AAAAAACACT A-TTAT----
Pichia pastoris BSYBG11: TTTGATTTTA ACGACTTTTA ACGACAACCT GAGAAGATCA AAAAAACACT AATTATTCGA
240

Pichia pastoris BSY12MS: -----
Pichia pastoris BSYBG11: AACGTAATTG AAATGTATTT AATTTGATAT TAAGTAAATG AATGATTATG ACTTTATGAA
300

Pichia pastoris BSY12MS: -----
Pichia pastoris BSYBG11: TTCGCAATGT TTTCTCCTTG ATTATTCTCG TATTGTATTG GAATGATTAT AGAATACTCA
360

Pichia pastoris BSY12MS: -----
Pichia pastoris BSYBG11: TATATTGATT ATAGTATTAG CACATAAAAC GTTTGTGTGT AAACCTCACTT CCGTACGCCAA
420

Pichia pastoris BSY12MS: -----
Pichia pastoris BSYBG11: CCATTTCCTAT TTCTAGCTAT CTTGATAAGG TTACCGTTCCG TATAGCATACT ATTATACGAA
480

Pichia pastoris BSY12MS: ----- GAACGGGAAGT TCCTATACTT TCTAGAGAAT AGGAACTTCT CAAGAGGATG
Pichia pastoris BSYBG11: CGGTAGCTAG -----CT CAAGAGGATG
540

Pichia pastoris BSY12MS: TCAGAATGCC ATTTGCCTGA GAGATGCAGG CTTCAATTTT GATACTTTTT TATTGTGTAAC
Pichia pastoris BSYBG11: TCAGAATGCC ATTTGCCTGA GAGATGCAGG CTTCAATTTT GATACTTTTT TATTGTGTAAC
600

Pichia pastoris BSY12MS: CTATATAGTA TAGGATTTTT TTTGTCATTT TGTTCCTTCT CGTACGAGCT TGCTCCTGAT
Pichia pastoris BSYBG11: CTATATAGTA TAGGATTTTT TTTGTCATTT TGTTCCTTCT CGTACGAGCT TGCTCCTGAT
660

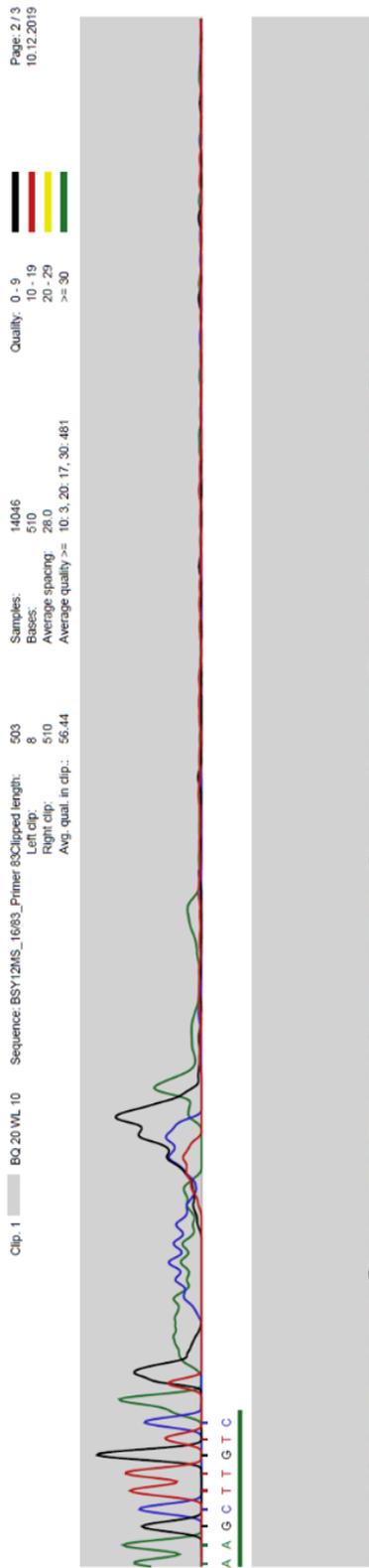
Pichia pastoris BSY12MS: CAGCCTATCT CGCAGCTGAT GAATATCTTG TGGTAGGGGT TTGGGAAAAT CATTGAGGTT
Pichia pastoris BSYBG11: CAGCCTATCT CGCAGCTGAT GAATATCTTG TGGTAGGGGT TTGGGAAAAT CATTGAGGTT
720

Pichia pastoris BSY12MS: TGATGTTTTT CTTGGTATTT CCCACTCCTC TTCAGAGTAC AGAAGATTAA GTGAGACGTT
Pichia pastoris BSYBG11: TGATGTTTTT CTTGGTATTT CCCACTCCTC TTCAGAGTAC AGAAGATTAA GTGAGACGTT
780

```

Abbildung A.3: Alignment der *P. pastoris* BSY12MS und *P. pastoris* BSYBG11 Gensequenzen

Ein “:” symbolisiert identische Basen, eine Lücke (“ “) steht für unterschiedliche Basen; Der *P. pastoris* BSY12MS WT weist im Vergleich zum *P. pastoris* BSYBG11 WT eine Deletion auf und es fehlt ein Bereich von 216 bp.



A.2.4 Alignment der *P. pastoris* BSY12MS Gensequenz (Primer 82)

```

Original: TAATATGACA AAAGCGTGAT CTCATCCAAG ATGAACTAAG TTTGGTTCGT TGAAATGCTA      60
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P82:      TAATATGACA AAAGCGTGAT CTCATCCAAG ATGAACTAAG TTTGGTTCGT TGAAATGCTA

Original: ACGGCCAGTT GGTCAAAAAG AAAGTTCCAA AAGTCGGCAT ACCGTTTGTC TTGTTTGGTA      120
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P82:      ACGGCCAGTT GGTCAAAAAG AAAGTTCCAA AAGTCGGCAT ACCGTTTGTC TTGTTTGGTA

Original: TTGATTGACG AATGCTCAA AATAATCTCA TTAATGCTTA GCGCAGTCTC TCTATCGCTT      180
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P82:      TTGATTGACG AATGCTCAA AATAATCTCA TTAATGCTTA GCGCAGTCTC TCTATCGCTT

Original: CTGAACCCCG GTGCACCTGT GCCGAAACGC AAATGGGGAA ACACCCGCTT TTTGGATGAT      240
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P82:      CTGAACCCCG GTGCACCTGT GCCGAAACGC AAATGGGGAA ACACCCGCTT TTTGGATGAT

Original: TATGCATTGT CTCCACATTG TATGCTTCCA AGATTCTGGT GGAATACTG CTGATAGCCT      300
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P82:      TATGCATTGT CTCCACATTG TATGCTTCCA AGATTCTGGT GGAATACTG CTGATAGCCT

Original: AACGTTTCATG ATCAAAATTT AACTGTTCTA ACCCCTACTT GACAGCAATA TATAACAGAA      360
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P82:      AACGTTTCATG ATCAAAATTT AACTGTTCTA ACCCCTACTT GACAGCAATA TATAACAGAA

Original: AGGAAGCTGC CCTGTCTTAA ACCTTTTTTT TTATCATCAT TATTAGCTTA CTTTCATAAT      420
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P82:      AGGAAGCTGC CCTGTCTTAA ACCTTTTTTT TTATCATCAT TATTAGCTTA CTTTCATAAT

Original: TGCGACTGGT TCCAATTGAC AAGCTTTTGA TTTTAACGAC TTTTAACGAC AACTTGAGAA      480
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P82:      TGCGACTGGT TCCAATTGAC AAGCTTTTGA TTTTAACGAC TTTTAACGAC AACTTGAGAA

Original: GATCAAAAAA CAACTATTAT GAACGGAAGT TCCTATACTT TCTAGAGAAT AGGAACTTCT      540
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P82:      GATCAAAAAA CAACTATTAT GAACGGAAGT TCCTATACTT TCTAGAGAAT AGGAACTTCT

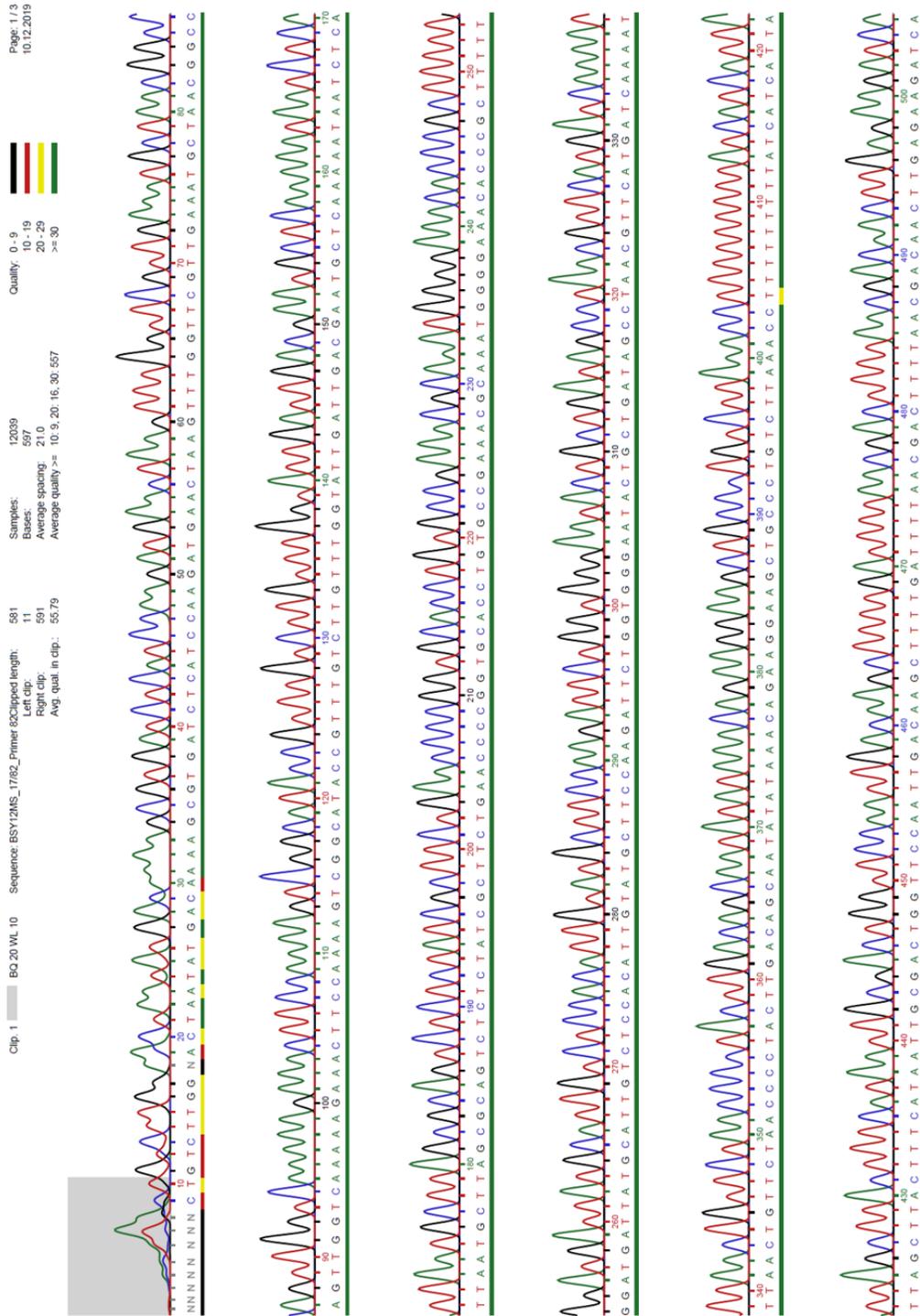
Original: CAAGAGGATG TCAGAATGCC      560
          ::::::::::: :::::::::::
P82:      CAAGAGGATG TCAGAATGCC

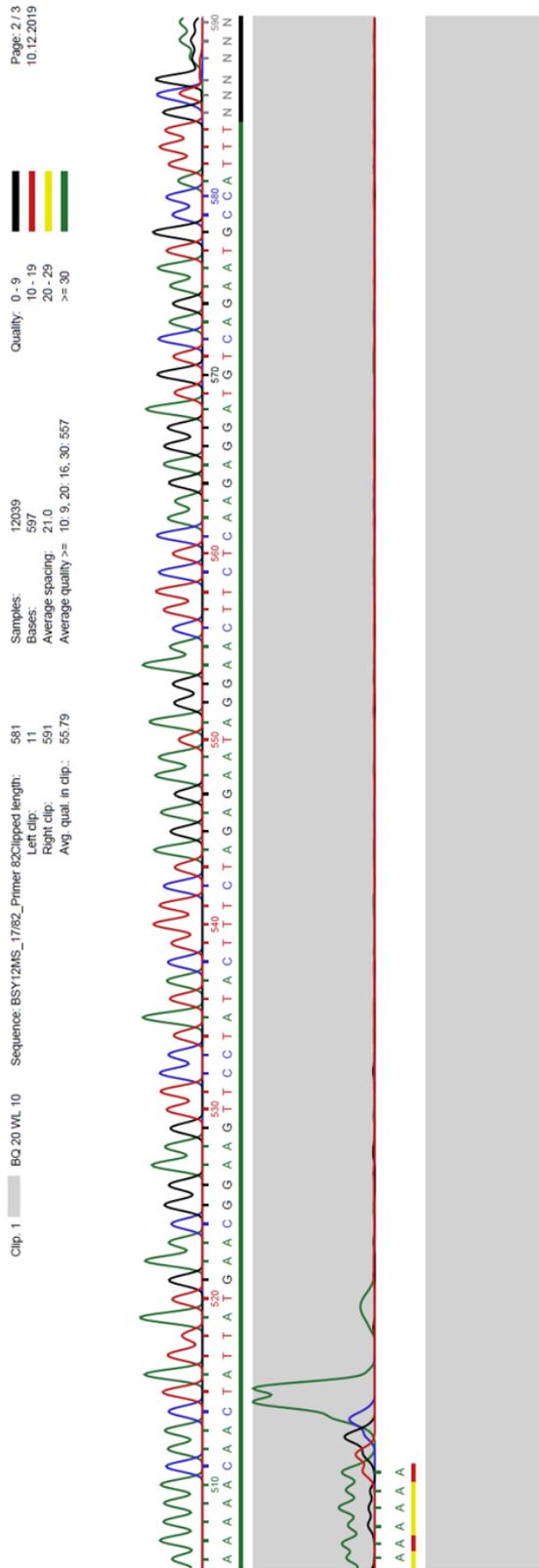
```

Abbildung A.5: Alignment der *P. pastoris* BSY12MS Gensequenz (Primer 82)

Ein “:” symbolisiert identische Basen, eine Lücke (“ ”) steht für unterschiedliche Basen.

A.2.5 Sequenzierungsreport der *P. pastoris* BSY12MS Gensequenz
(Primer 82)





A.2.6 Alignment der *P. pastoris* BSY12MS Gensequenz (Primer 18)

```

Original: GCATTCACGC CATTGCTTTT GAGATCGACT GCAGCTTTGA TGCCTGAAAT CCCAGCGCCT      60
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      GCATTCACGC CATTGCTTTT GAGATCGACT GCAGCTTTGA TGCCTGAAAT CCCAGCGCCT

Original: ACAATGATGA CATTGGATT TGGTTGACTC ATGTTGGTAT TGTGAAATAG ACGCAGATCG      120
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      ACAATGATGA CATTGGATT TGGTTGACTC ATGTTGGTAT TGTGAAATAG ACGCAGATCG

Original: GGAACACTGA AAAATAACAG TTATTATTCG AGATCTAACA TCCAAAGACG AAAGGTTGAA      180
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      GGAACACTGA AAAATAACAG TTATTATTCG AGATCTAACA TCCAAAGACG AAAGGTTGAA

Original: TGAAACCTTT TTGCCATCCG ACATCCACAG GTCCATTCTC ACACATAAGT GCCAAACGCA      240
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      TGAAACCTTT TTGCCATCCG ACATCCACAG GTCCATTCTC ACACATAAGT GCCAAACGCA

Original: ACAGGAGGGG ATACACTAGC AGCAGACCGT TGCAAACGCA GGACCTCCAC TCCTCTTCTC      300
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      ACAGGAGGGG ATACACTAGC AGCAGACCGT TGCAAACGCA GGACCTCCAC TCCTCTTCTC

Original: CTCAACACCC ACTTTTGCCA TCGAAAAACC AGCCAGTTA TTGGGCTTGA TTGGAGCTCG      360
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      CTCAACACCC ACTTTTGCCA TCGAAAAACC AGCCAGTTA TTGGGCTTGA TTGGAGCTCG

Original: CTCATTCCAA TTCCTTCTAT TAGGCTACTA ACACCATGAC TTTATTAGCC TGTCTATCCT      420
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      CTCATTCCAA TTCCTTCTAT TAGGCTACTA ACACCATGAC TTTATTAGCC TGTCTATCCT

Original: GGCCCCCTG GCGAGGTTCA TGTTTGTTTA TTTCCGAATG CAACAAGCTC CGCATTACAC      480
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      GGCCCCCTG GCGAGGTTCA TGTTTGTTTA TTTCCGAATG CAACAAGCTC CGCATTACAC

Original: CCGAACATCA CTCCAGATGA GGGCTTCTG AGTG TGGGGT CAAATAGTTT CATGTTCCCC      540
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      CCGAACATCA CTCCAGATGA GGGCTTCTG AGTG TGGGGT CAAATAGTTT CATGTTCCCC

Original: AAATGGCCCA AACTGACAG TTTAAACGCT GTCTTGGAAC CTAATATGAC AAAAGCGTGA      600
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P18:      AAATGGCCCA AACTGACAG TTTAAACGCT GTCTTGGAAC CTAATATGAC AAAAGCGTGA

```

A ANHANG

```
Original: TCTCATCCAA GATGAACTAA GTTTGGTTCG TTGAAATGCT AACGGCCAGT TGGTCAAAAA 660
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      TCTCATCCAA GATGAACTAA GTTTGGTTCG TTGAAATGCT AACGGCCAGT TGGTCAAAAA

Original: GAAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT CTTGTTTGGT ATTGATTGAC GAATGCTCAA 720
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      GAAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT CTTGTTTGGT ATTGATTGAC GAATGCTCAA

Original: AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG 780
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG

Original: TGCCGAAACG CAAATGGGGA AACACCCGCT TTTTGGATGA TTATGCATG TCTCCACATT 840
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      TGCCGAAACG CAAATGGGGA AACACCCGCT TTTTGGATGA TTATGCATG TCTCCACATT

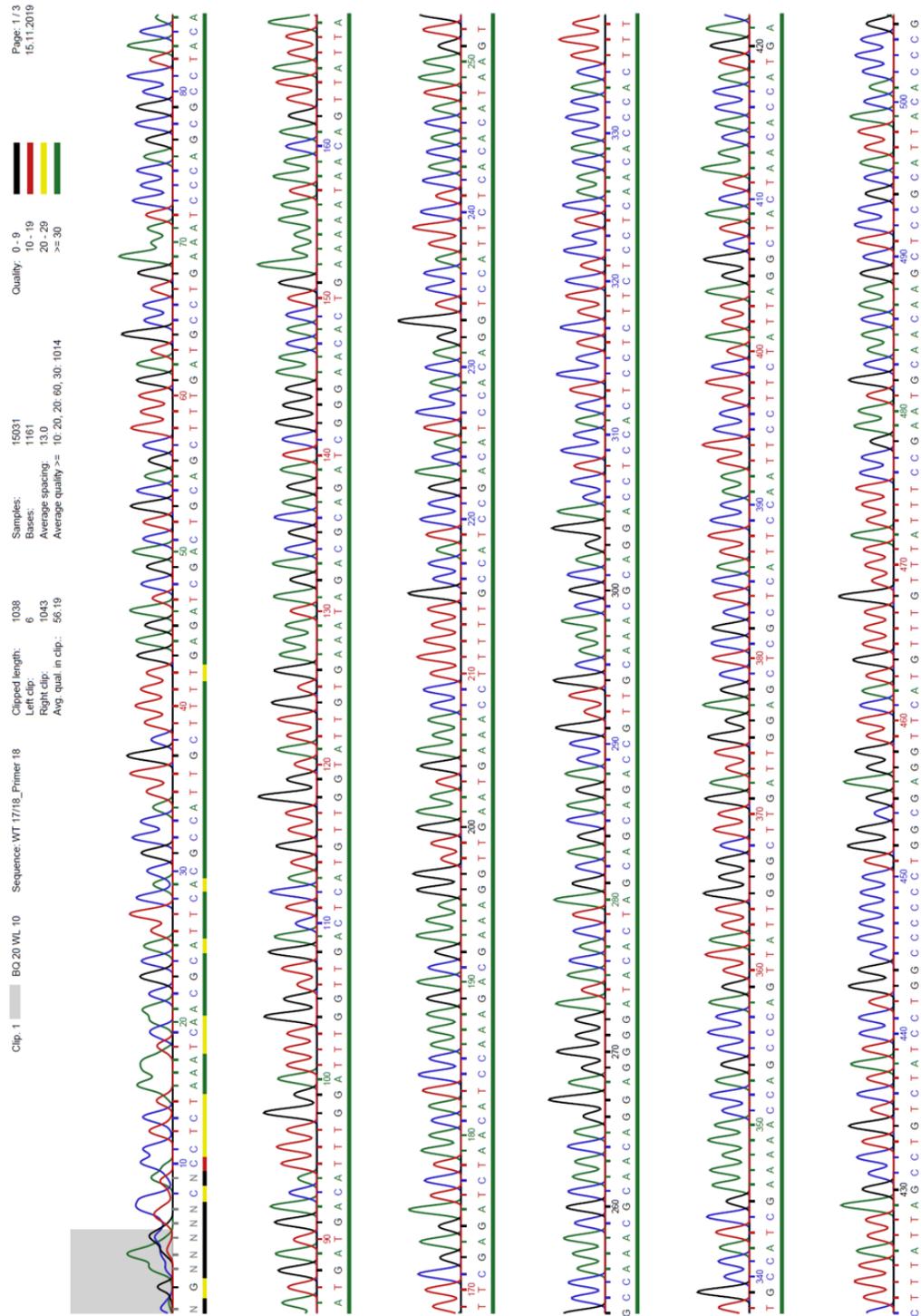
Original: GTATGCTTCC AAGATTCTGG TGGGAATACT GCTGATAGCC TAACGTTCAT GATCAAAATT 900
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      GTATGCTTCC AAGATTCTGG TGGGAATACT GCTGATAGCC TAACGTTCAT GATCAAAATT

Original: TAACTGTTCT AACCCCTACT TGACAGCAAT ATATAAACAG AAGGAAGCTG CCCTGTCTTA 960
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      TAACTGTTCT AACCCCTACT TGACAGCAAT ATATAAACAG AAGGAAGCTG CCCTGTCTTA
```

Abbildung A.6: Alignment der *P. pastoris* BSY12MS Gensequenz (Primer 18)

Ein “:“ symbolisiert identische Basen, eine Lücke (“ ”) steht für unterschiedliche Basen.

A.2.7 Sequenzierungsreport der *P. pastoris* BSY12MS Gensequenz
(Primer 18)




```

Original: TCTCATCCAA GATGAACTAA GTTTGGTTCG TTGAAATGCT AACGGCCAGT TGGTCAAAAA 660
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      TCTCATCCAA GATGAACTAA GTTTGGTTCG TTGAAATGCT AACGGCCAGT TGGTCAAAAA

Original: GAAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT CTTGTTTGGT ATTGATTGAC GAATGCTCAA 720
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      GAAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT CTTGTTTGGT ATTGATTGAC GAATGCTCAA

Original: AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG 780
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG

Original: TGCCGAAACG CAAATGGGGA AACACCCGCT TTTTGGATGA TTATGCATTG TCTCCACATT 840
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      TGCCGAAACG CAAATGGGGA AACACCCGCT TTTTGGATGA TTATGCATTG TCTCCACATT

Original: GTATGCTTCC AAGATTCTGG TGGGAATACT GCTGATAGCC TAACGTTCAT GATCAAAATT 900
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      GTATGCTTCC AAGATTCTGG TGGGAATACT GCTGATAGCC TAACGTTCAT GATCAAAATT

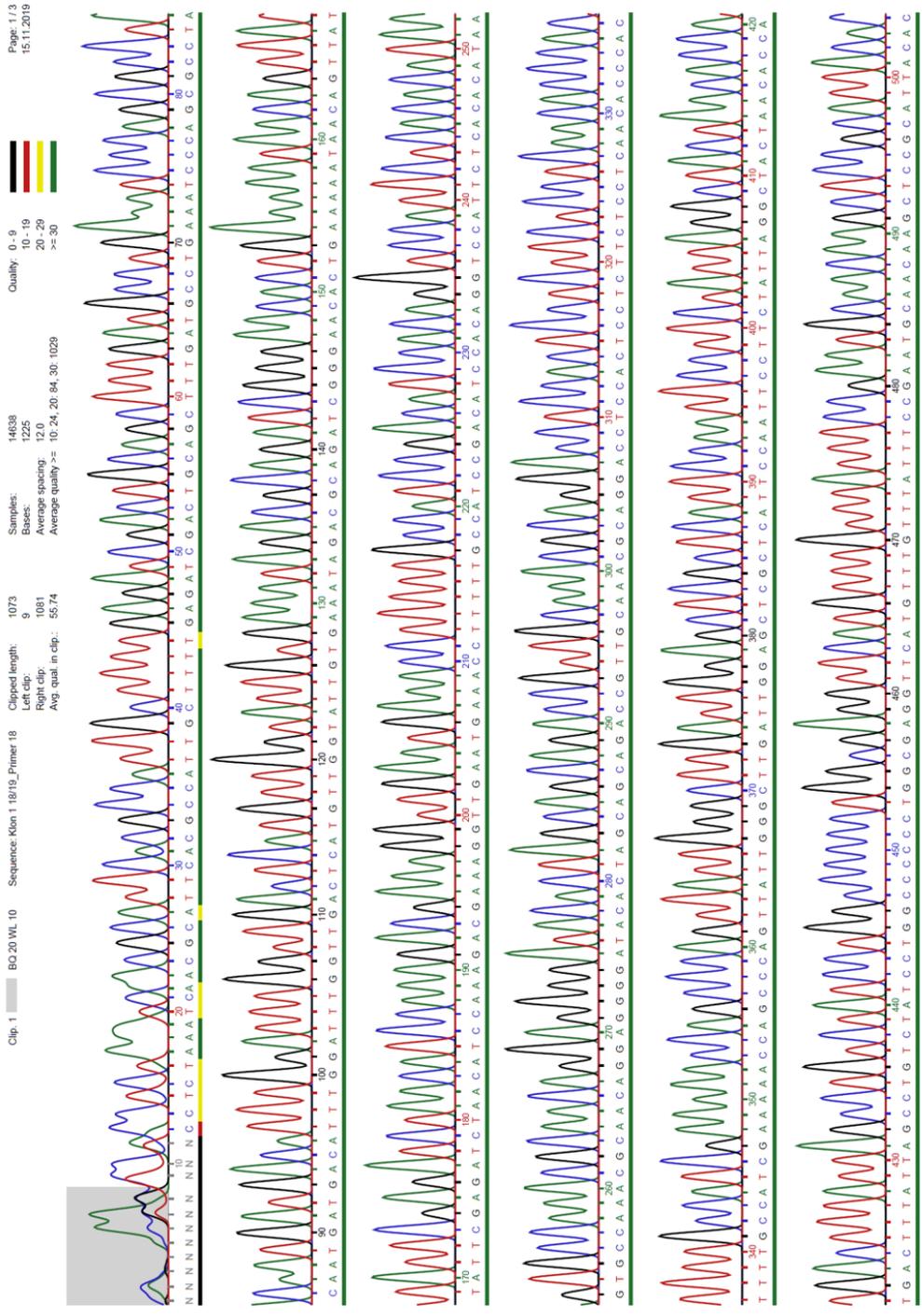
Original: TAACTGTCTT AACCCTACT TGACAGCAAT ATATAAACAG AAGGAAGCTG CCCTGTCTTA 960
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P18:      TAACTGTCTT AACCCTACT TGACAGCAAT ATATAAACAG AAGGAAGCTG CCCTGTCTTA

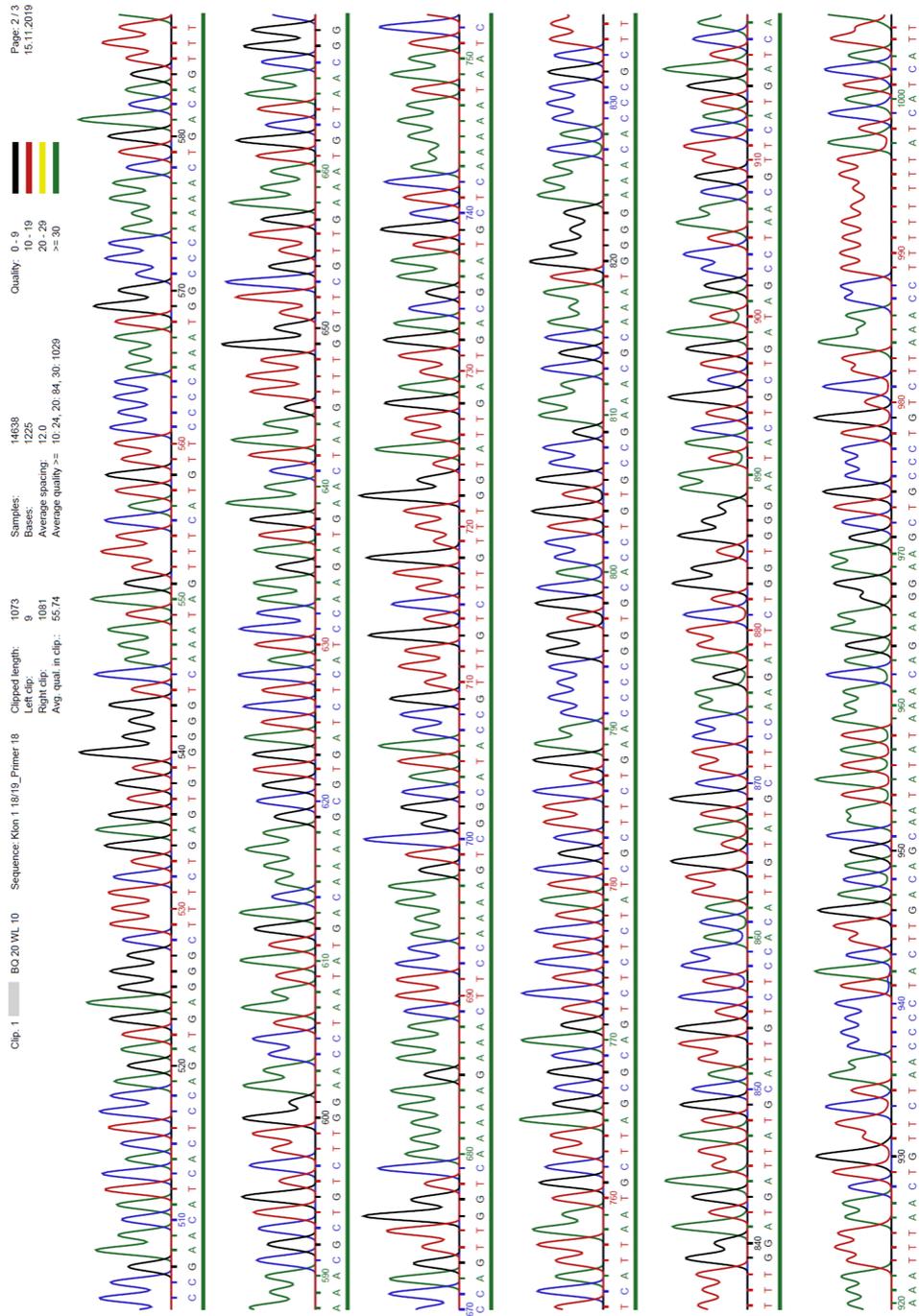
```

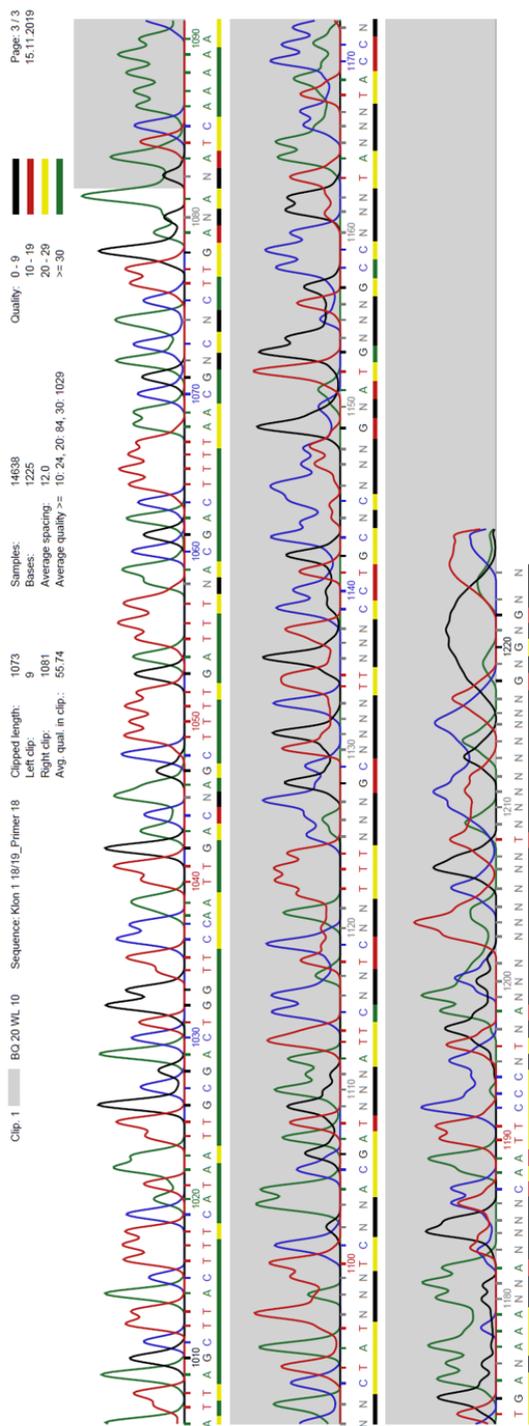
Abbildung A.7: Alignment der linken Flanke (Primer 18)

Ein “:“ symbolisiert identische Basen, eine Lücke (“ ”) steht für unterschiedliche Basen.

A.3.2 Sequenzierungsreport der linken Flanke (Primer 18)







A.3.3 Alignment der linken Flanke (Primer 19)

```

Original:  AGCCAGTTA TTGGGCTGA TTGGAGCTCG CTCATTCCAA TTCCTTCTAT TAGGCTACTA      60
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      AGCCAGTTA TTGGGCTGA TTGGAGCTCG CTCATTCCAA TTCCTTCTAT TAGGCTACTA

Original:  ACACCATGAC TTTATTAGCC TGTCTATCCT GGCCCCCCTG GCGAGGTCA TGTTTGTTTA      120
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      ACACCATGAC TTTATTAGCC TGTCTATCCT GGCCCCCCTG GCGAGGTCA TGTTTGTTTA

Original:  TTTCCGAATG CAACAAGCTC CGCATTACAC CCGAACATCA CTCCAGATGA GGGCTTTCTG      180
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      TTTCCGAATG CAACAAGCTC CGCATTACAC CCGAACATCA CTCCAGATGA GGGCTTTCTG

Original:  AGTGTGGGGT CAAATAGTTT CATGTTCCCC AAATGGCCCA AAAGTGCAG TTTAAACGCT      240
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      AGTGTGGGGT CAAATAGTTT CATGTTCCCC AAATGGCCCA AAAGTGCAG TTTAAACGCT

Original:  GTCTTGGAAC CTAATATGAC AAAAGCGTGA TCTCATCCAA GATGAACTAA GTTTGGTTCCG      300
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      GTCTTGGAAC CTAATATGAC AAAAGCGTGA TCTCATCCAA GATGAACTAA GTTTGGTTCCG

Original:  TTGAAATGCT AACGGCCAGT TGGTCAAAAA GAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT      360
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      TTGAAATGCT AACGGCCAGT TGGTCAAAAA GAACTTCCA AAAGTCGGCA TACCGTTTGT

Original:  CTTGTTGGT ATTGATTGAC GAATGCTCAA AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT      420
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      CTTGTTGGT ATTGATTGAC GAATGCTCAA AAATAATCTC ATTAATGCTT AGCGCAGTCT

Original:  CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG TGCCGAAACG CAAATGGGGA AACACCCGCT      480
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      CTCTATCGCT TCTGAACCCC GGTGCACCTG TGCCGAAACG CAAATGGGGA AACACCCGCT

Original:  TTTTGGATGA TTATGCATTG TCTCCACATT GTATGCTTCC AAGATTCTGG TGGGAATACT      540
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      TTTTGGATGA TTATGCATTG TCTCCACATT GTATGCTTCC AAGATTCTGG TGGGAATACT

Original:  GCTGATAGCC TAACGTTCAT GATCAAAATT TAACTGTTCT AACCCCTACT TGACAGCAAT      600
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P19:      GCTGATAGCC TAACGTTCAT GATCAAAATT TAACTGTTCT AACCCCTACT TGACAGCAAT

```

```

Original: ATATAAACAG AAGGAAGCTG CCCTGTCTTA AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT      660
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P19:      ATATAAACAG AAGGAAGCTG CCCTGTCTTA AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT

Original: ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA      720
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P19:      ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA

Original: CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT ATTGAAACG ATGAGATTCC CATCTATTTT      780
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P19:      CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT ATTGAAACG ATGAGATTCC CATCTATTTT

Original: CACCGCTGTC TTGTTGCTG CCTCCTCTGC ATTGGCTGCC CCTGTAAACA CTACCACTGA      840
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P19:      CACCGCTGTC TTGTTGCTG CCTCCTCTGC ATTGGCTGCC CCTGTAAACA CTACCACTGA

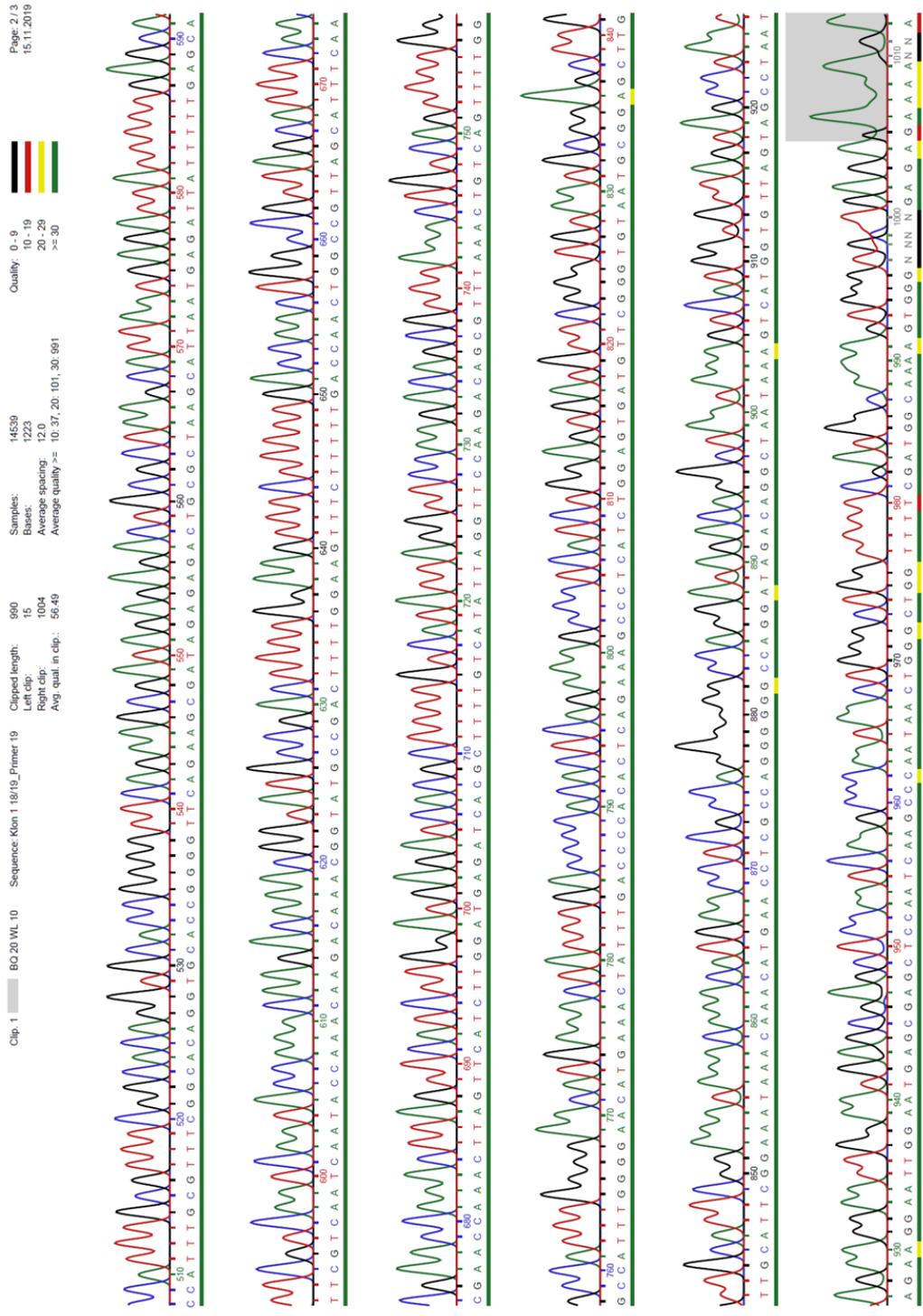
Original: AGACGAGACT GCTCAAATTC CAGCTGAAGC AGTTATCGGT TACTCTGACC TTGAGGGTGA      900
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P19:      AGACGAGACT GCTCAAATTC CAGCTGAAGC AGTTATCGGT TACTCTGACC TTGAGGGTGA

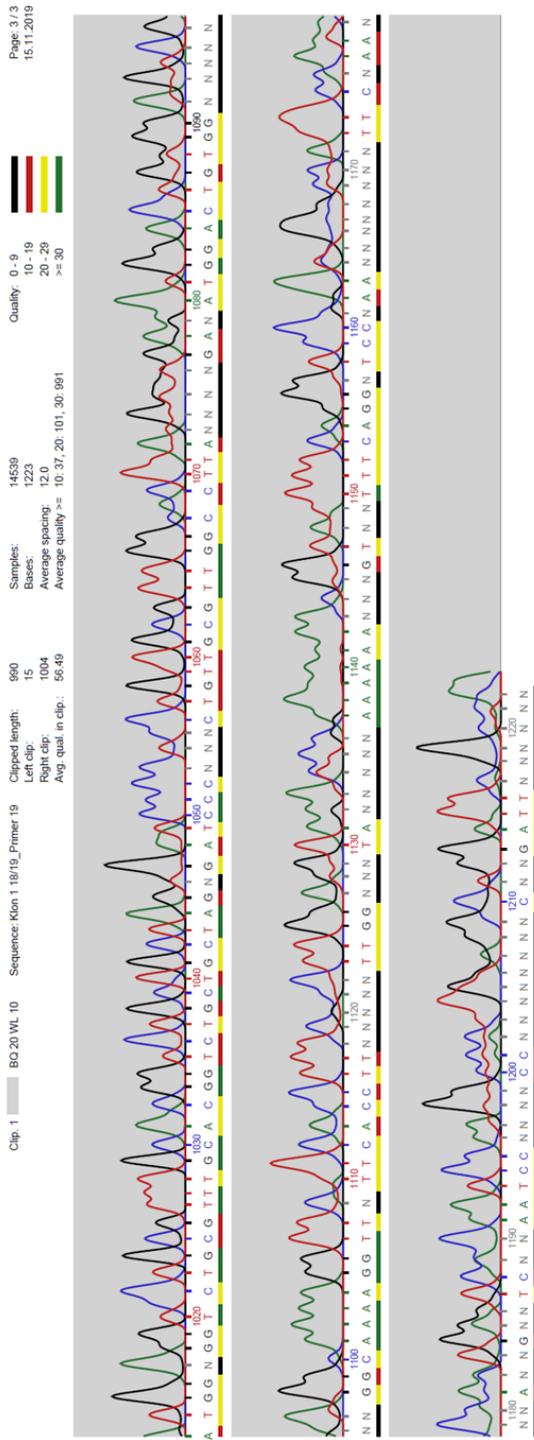
Original: TTTCGACGTC GCTGTTTTGC CTTTCTCTAA CTCCACTAAC AACGGTTTGT      950
          ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
P19:      TTTCGACGTC GCTGTTTTGC CTTTCTCTAA CTCCACTAAC AACGGTTTGT

```

Abbildung A.8: Alignment der linken Flanke (Primer 19)

Ein “:” symbolisiert identische Basen, eine Lücke (“ ”) steht für unterschiedliche Basen.





A.3.5 Alignment der rechten Flanke (Primer 20)

```

Original:   TGAATGAAAC CTTTTTGCCA TCCGACATCC ACAGGTCCAT TCTCACACAT AAGTGCCAAA
:           :           :           :           :           :           :
P20:       TGAATGAAAC CTTTTTGCCA TCCGACATCC ACAGGTCCAT TCTCACACAT AAGTGCCAAA
    
```

```

Original:   CGCAACAGGA GGGGATACAC TAGCAGCAGA CCGTTGCAAA CGCAGGACCT CCACTCCTCT
:           :           :           :           :           :           :
P20:       CGCAACAGGA GGGGATACAC TAGCAGCAGA CCGTTGCAAA CGCAGGACCT CCACTCCTCT
    
```

```

Original:   TCTCCTCAAC ACCCACTTTT GCCATCGAAA AACCAGCCCA GTTATTGGGC TTGATTGGAG
:           :           :           :           :           :           :
P20:       TCTCCTCAAC ACCCACTTTT GCCATCGAAA AACCAGCCCA GTTATTGGGC TTGATTGGAG
    
```

```

Original:   CTCGCTCATT CCAATTCCTT CTATTAGGCT ACTAACACCA TGACTTTATT AGCCTGTCTA
:           :           :           :           :           :           :
P20:       CTCGCTCATT CCAATTCCTT CTATTAGGCT ACTAACACCA TGACTTTATT AGCCTGTCTA
    
```

```

Original:   TCCTGGCCCC CCTGGCGAGG TTCATGTTTG TTTATTCCG AATGCAACAA GCTCCGCATT
:           :           :           :           :           :           :
P20:       TCCTGGCCCC CCTGGCGAGG TTCATGTTTG TTTATTCCG AATGCAACAA GCTCCGCATT
    
```

```

Original:   ACACCCGAAC ATCACTCCAG ATGAGGGCTT TCTGAGTGTG GGGTCAAATA GTTTCATGTT
:           :           :           :           :           :           :
P20:       ACACCCGAAC ATCACTCCAG ATGAGGGCTT TCTGAGTGTG GGGTCAAATA GTTTCATGTT
    
```

```

Original:   CCCCAAATGG CCCAAAAGTC ACAGTTTAAA CGCTGTCTTG GAACCTAATA TGACAAAAGC
:           :           :           :           :           :           :
P20:       CCCCAAATGG CCCAAAAGTC ACAGTTTAAA CGCTGTCTTG GAACCTAATA TGACAAAAGC
    
```

```

Original:   GTGATCTCAT CCAAGATGAA CTAAGTTTGG TTCGTTGAAA TGCTAACGGC CAGTTGGTCA
:           :           :           :           :           :           :
P20:       GTGATCTCAT CCAAGATGAA CTAAGTTTGG TTCGTTGAAA TGCTAACGGC CAGTTGGTCA
    
```

```

Original:   AAAAGAAACT TCCAAAAGTC GGCATACCGT TTGTCTTGTT TGGTATTGAT TGACGAATGC
:           :           :           :           :           :           :
P20:       AAAAGAAACT TCCAAAAGTC GGCATACCGT TTGTCTTGTT TGGTATTGAT TGACGAATGC
    
```

```

Original:   TCAAAAATAA TCTCATTAAT GCTTAGCGCA GTCTCTCTAT CGCTTCTGAA CCCCAGTGCA
:           :           :           :           :           :           :
P20:       TCAAAAATAA TCTCATTAAT GCTTAGCGCA GTCTCTCTAT CGCTTCTGAA CCCCAGTGCA
    
```

```

Original: CCTGTGCCGA AACGCAAATG GGGAAACACC CGCTTTTGG ATGATTATGC ATTGCTCTCA 660
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P20:      CCTGTGCCGA AACGCAAATG GGGAAACACC CGCTTTTGG ATGATTATGC ATTGCTCTCA

Original: CATTGTATGC TTCCAAGATT CTGGTGGGAA TACTGCTGAT AGCCTAACGT TCATGATCAA 720
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P20:      CATTGTATGC TTCCAAGATT CTGGTGGGAA TACTGCTGAT AGCCTAACGT TCATGATCAA

Original: AATTTAACTG TTCTAACCCC TACTTGACAG CAATATATAA ACAGAAGGAA GCTGCCCTGT 780
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P20:      AATTTAACTG TTCTAACCCC TACTTGACAG CAATATATAA ACAGAAGGAA GCTGCCCTGT

Original: CTTAAACCTT TTTTTTTATC ATCATTATTA GCTTACTTTC ATAATTGCGA CTGGTTCCAA 840
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P20:      CTTAAACCTT TTTTTTTATC ATCATTATTA GCTTACTTTC ATAATTGCGA CTGGTTCCAA

Original: TTGACAAGCT TTTGATTTTA ACGACTTTTA ACGACAACCTT GAGAAGATCA AAAAACAAC 900
          :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P20:      TTGACAAGCT TTTGATTTTA ACGACTTTTA ACGACAACCTT GAGAAGATCA AAAAACAAC

Original: ATTATGAACG GAAGTTCCTA TACTTTCTAG 930
          :::::::::: :::::::::: ::::::::::
P20:      ATTATGAACG GAAGTTCCTA TACTTTCTAG

```

Abbildung A.9: Alignment der rechten Flanke (Primer 20)

Ein “:“ symbolisiert identische Basen, eine Lücke (“ “) steht für unterschiedliche Basen.

A.3.6 Sequenzierungsreport der rechten Flanke (Primer 20)

