

**Analyse der Transformationseffizienz sowie CRISPR-Cas9-
basierter Mutationen in *Lactococcus* spp.**

an der Universität Hamburg eingereichte Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Institut für Lebensmittelchemie, Fachbereich Chemie

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

vorgelegt von

M. Sc. Melina Teresa Piesch

Hamburg, 2026

Erstgutachterin: Prof. DI Dr. Agnes Weiß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit

Disputation und Druckfreigabe:

Disputation: 26. Juni 2026

Druckfreigabe: 01. Juli 2026

Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. DI Dr. Agnes Weiß

PD Dr. Ines Krohn

Prof. Dr. Markus Fischer

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2022 bis Dezember 2025 unter der wissenschaftlichen Betreuung und technischen Anleitung von Prof. DI Dr. Agnes Weiß in der Arbeitsgruppe Lebensmittelmikrobiologie an der Hamburg School of Food Science – Institut für Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg angefertigt.

I Publikationsliste

Peer-reviewed Journal Artikel

Piesch, M., García, P. P., Hinrichs, J., Schmidt, H., Nieselt, K., Weiss, A. Calcium-Dependent Transcriptional Responses alongside Genomic Characterization and Phylogenetic Relationships of *Lactococcus* spp. Dairy Starter Cultures. (*submitted*)

Vorträge auf Fachkonferenzen

Piesch, M. Insights into the genome of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus cremoris* starter cultures. Fachgruppentreffen Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie der DGHM und VAAM, 01.-03.04.2025, Berlin, Deutschland.

Piesch, M. Herausforderungen und Chancen der Genom Editierung von *L. lactis* Stämmen. Fachgruppentreffen Fachgruppe Qualitätsmanagement der VAAM, 12.-13.09.2024, Gießen/Pohlheim, Deutschland.

Poster

Piesch, M., García, P. P., Weiss, A. Insights into the genome of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus cremoris* starter cultures. DGHM Jahrestagung 2025, 22.-24.09.2025, Jena, Deutschland.

Piesch, M. Weiss, A. Different methods of employing the CRISPR-Cas9 toolbox for mutagenesis of starter culture strains using cheese manufacture isolate *Lactococcus lactis*. DGHM & VAAM Jahrestagung 2024, 02.-05.06.2024, Würzburg, Deutschland.

Piesch, M. Weiss, A. Establishing CRISPR-Cas9 for site specific mutagenesis in *Lactococcus lactis*. FEMS 2023, 09.-13.07.2023, Hamburg, Deutschland.

II Mitbetreute Abschlussarbeiten

Folgende Abschlussarbeiten am Fachbereich Chemie wurden im Zusammenhang der Promotion mitbetreut.

Bachelorarbeiten

Jasmin-Aylin Saf: Konstruktion von Shuttle-Vektoren zur genetischen Modifikation von *Lactococcus lactis* (2024).

Annika Schuster: Untersuchung der Transformationseffizienz und Induzierbarkeit von Mehrplasmidsystemen in *Lactococcus cremoris* LTH 7122 (2025).

Luca Rudolph: Transformation und nisin-induzierte Expression des recT-Gens in *Lactococcus cremoris* LTH 7122 und *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LTH 7123 (2025).

Masterarbeiten

Laura Rumask: Construction and Validation of a Recombinant Plasmid for *Lactococcus lactis* Genetic Engineering (2024).

III Inhaltsverzeichnis

I Publikationsliste.....	i
Peer-reviewed Journal Artikel.....	i
Vorträge auf Fachkonferenzen	i
Poster.....	i
II Mitbetreute Abschlussarbeiten	ii
III Inhaltsverzeichnis	iii
IV Abkürzungsverzeichnis	viii
V Abbildungsverzeichnis	x
VI Tabellenverzeichnis	xii
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract.....	3
3 Einleitung und Kenntnisstand	5
3.1 Eigenschaften und taxonomische Einordnung von <i>Lactococcus</i> spp.....	5
3.2 Das proteolytische System von <i>Lactococcus</i> spp.....	5
3.2.1 Die Proteinase PrtP	6
3.2.2 Transporter und Peptidasen	9
3.2.3 Der Transkriptionsregulator CodY	9
3.2.4 Bitterpeptide in fermentierten Milchprodukten.....	9
3.3 Plasmide in Milchsäurebakterien.....	11
3.3.1 <i>Rolling Circle</i> Plasmide.....	11
3.3.2 Theta-replizierende Plasmide	13
3.4 Genom-Editierung in Milchsäurebakterien.....	14
3.4.1 Plasmide zur Genom-Editierung	15
3.4.2 Genom-Editierung mittels Rekombinationstechnik.....	17
3.4.3 CRISPR-Cas9	20
3.4.4 Transformation rekombinanter Plasmide in <i>Lactococcus</i> spp	23
3.4.5 Schwierigkeiten der Plasmid-vermittelten Genom-Editierung in <i>Lactococcus</i> spp.....	23
4 Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit	25

III Inhaltsverzeichnis

5 Materialien.....	28
5.1 Stammlösungen, Puffer, Chemikalien, Reagenzien, Kits und Geräte	28
5.2 Nährmedien und Zusätze	29
5.3 Bakterienstämme sowie Primer, Plasmide und <i>Spacer</i>	30
6 Methoden	37
6.1 Stammhaltung und Übernachtskulturen	37
6.1.1 Inkubation in Milchcitrat-Boullion	37
6.1.2 Messung der optischer Dichte	37
6.2 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Elektroporation.....	38
6.2.1 Blau-Weiß Screening von transformierten <i>E. coli</i> DH5 α	38
6.2.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> WM3064	39
6.3 Herstellung elektrokompetenter <i>Lactococcus</i> spp. Zellen und Elektroporation	39
6.3.1 Nisin-Induzierung nach Guo et al.....	39
6.3.2 Nisin-Induzierung nach Berlec et al.	40
6.3.3 Elektroporation in Starterkulturen	40
6.3.4 Bestimmung der Glycin-Toleranz der Starterkulturstämme.....	41
6.4 Erstellung der Oligonukleotide als <i>Spacer</i> für die CRISPR-Cas9 Kasette.....	41
6.5 Erstellung des Plasmids pTRCas9 mit <i>Spacern</i>	42
6.5.1 Klonierung der <i>Spacer</i> auf pCas9.....	42
6.5.2 Restriktion des Vektors pTRKH2	44
6.5.3 Ligation von pCas9 mit <i>Spacern</i> und pTRKH2.....	44
6.5.4 Erstellung der Plasmide pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop	46
6.6 Erstellung des Plasmids pTRCas9PstI	47
6.7 Erstellung des Plasmids pTRCas9 aus pTRCas9PstI	49
6.7.1 Klonierung der <i>Spacer</i> in das Plasmid pTRCas9	50
6.8 Hitzeschock Transformation in <i>E. coli</i> WM3064	50
6.9 Konjugation von <i>E. coli</i> WM3064 und <i>L. cremoris</i> LTH7122.....	51
6.10 Erstellung des Plasmids pNZrecTLR.....	52
6.10.1 Erstellung des Plasmids pNZrecTPG aus pNZrecTLR mittels HiFi-Assembly	53
6.11 Elektroporationsansätze in <i>Lactococcus</i> spp.....	55

6.11.1 Nachweis des Plasmids pTRCas9 in <i>L. cremoris</i> NZ9000	56
6.11.2 Nachweis des Plasmids pNZ8048 in den Starterkulturstämmen	57
6.11.3 Nachweis des Plasmids pTRKH2 in <i>L. lactis</i> LTH 7123	57
6.12 Amplifikation des Xylose Promotors von <i>L. lactis</i> LTH 3882	57
6.12.1 Klonierung des Xylose Promotor auf das Plasmid pNZrecTLR zur Erstellung des Plasmids pNZrecTGV	58
6.13 Elektroporation der Starterkulturstämme mit pNZrecTGV	60
6.13.1 Elektroporation mit Reparatur-Template in Xylose induzierte Starterkulturen	61
6.13.2 MAMA-PCR zum Nachweis der Mutationen S620Gly und S620Stop des <i>prtP</i> -Gens in Starterkulturen	63
6.13.3 Transformation von Plasmid pTRKH2-Derivaten in Xylose induzierte Starterkulturstämme	68
6.14 Transformation des Plasmids pTRCas9 mit <i>Spacern</i> in Nisin induzierte <i>L. cremoris</i> NZ9000 und Nachweis von Mutationen mittels PCR	69
6.15 Proteinisolation und SDS-PAGE induzierter <i>L. cremoris</i> NZ9000 Zellen	72
6.15.1 Xylose induzierte Zellen für SDS-PAGE	72
6.15.2 Nisin induzierte Zellen für SDS-PAGE	73
7 Ergebnisse und ergebnisbezogene Diskussion	74
7.1 Klonierung der <i>Spacer</i> 1D217 und 2D217 in das Plasmid pCas9	74
7.1.1 Klonierung der CRISPR-Cas9 Kasette mit <i>Spacern</i> in das Plasmid pTKRH2	74
7.2 Erstellung der Plasmide pTRCas9PstI und pTRCas9	76
7.2.1 Erstellung der Plamide pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop	79
7.3 Elektroporation von <i>L. cremoris</i> NZ9000 mit dem Plasmid pTRCas9 und Nachweis des Plasmids	80
7.4 Erstellung des Plasmids pNZrecTLR	81
7.5 Erstellung des Plasmids pNZrecTPG aus pNZrecTLR	83
7.6 Erstellung des Plasmids pNZrecTGV	84
7.7 Transformation verschiedener Plasmide in <i>Lactococcus</i> spp.	85
7.8 Glycintoleranz der Starterkulturstämme	87
7.8.1 Transformation von pNZrecTGV in Starterkulturen mit optimiertem Glycingehalt ..	87
7.8.2 Transformation von pTRKH2-Derivaten bei optimiertem Glycingehalt	88

7.9 Konjugation des Plasmids pTRCas9.25A von <i>E. coli</i> WM3064 in <i>L. cremoris</i> LTH7122	90
7.10 Transformation Xylose induzierter Starterkulturen und Nachweis mittels MAMA-PCR	91
7.10.1 Ergebnisse der MAMA-PCR von <i>L. lactis</i> LTH 7123	93
7.10.2 Ergebnisse der MAMA-PCR von <i>L. cremoris</i> LTH 7122.....	96
7.11 Elektroporation von pTRKH2-Derivaten in Xylose induzierte Starterkulturen.....	98
7.12 Vergleich von Transformationseffizienzen in <i>L. cremoris</i> LTH 7122 und <i>L. lactis</i> LTH 7123.....	100
7.13 Vergleich der Methoden zur Nisin-Induzierung anhand der Transformationseffizienz	101
7.14 Einbau von Punktmutationen in <i>L. cremoris</i> NZ9000 durch CRISPR-Cas9	103
7.15 SDS-PAGE der Xylose- und Nisin-Induzierung des <i>L. cremoris</i> NZ9000.....	105
7.16 Fermentationsversuch der Mutanten mit Milchcitrat-Boullion.....	107
7.17 Weitere Ergebnisse dieser Doktorarbeit: Sequenzierung und phylogenetische Einordnung der Starterkulturstämmen	108
8 Literaturgestützte Diskussion der Ergebnisse und Ausblick	112
8.1 Transformation in <i>Lactococcus</i> spp. und Optimierung durch Glycin-Konzentration ...	112
8.2 Konjugation bei <i>Lactococcus</i> spp.....	116
8.3 CRISPR-Cas9 in Milchsäurebakterien	117
8.4 ssDNA-Rekombination in Milchsäurebakterien im Vergleich zu den Starterkulturstämmen.....	122
8.5 Xylose-Induzierung bei <i>Lactococcus</i> spp.	125
8.6 Mutation von Genen des proteolytischen Systems zur Reduktion von Bitterpeptiden	127
8.7 Ausblick	128
9 Literaturverzeichnis	129
10 Anhang.....	I
I Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	I
II Auflistung der verwendeten Geräte.....	VII
III Allgemeine Verfahren.....	IX

III Inhaltsverzeichnis

III.1 Restriktionsverdau.....	IX
III.2 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	IX
III.3 Kolonie-PCR.....	X
III.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	XI
III.5 SDS-PAGE Elektrophorese.....	XI
III.5 Reinigung von PCR-Amplifikaten vor Sanger-Sequenzierung.....	XII
III.6 Plasmidisolierung aus Gram-positiven Bakterien.....	XII
IV Plasmidkarten.....	XIII
V Agarosegel-Bilder und Ausschnitt der Sequenzierung.....	XVII
V.1 Agarosegel mit Plasmidisolierungen der Plasmide p428.1D und p428.2D.....	XVII
V.2 Agarosegel mit Amplifikaten der Kolonie-PCR des Plasmids pTRCas9oppDBind1	XVII
V.3 Agarosegel mit Amplifikaten der Kolonie-PCR des HiFi-Assemblys.....	XVIII
V.4 Agarosegel des Amplifikats des Xylose Promotor von <i>L. lactis</i> LTH 3882.....	XVIII
V.5 Agarosegel des Xylose Promotor mit Klonierungs-Primern und <i>Taq</i> DNA-Polymerase	XVIII
V.6 Agarosegel des Plasmids pTRKH2 und pNZ8048 in Starterkulturen oder <i>L. lactis</i> LTH 7123.....	XIX
V.7 Agarosegel der Amplifikate der MAMA-PCR Xylose induzierter Zellen.....	XX
V.8 Agarosegel der Amplifikate der MAMA-PCR der Transformation des Plasmids pTRCas9oppDBind1.....	XX
V.9 Sequenzierung des Berlec long Klons mit pTRCas9gal.....	XXI
VI Koloniezahlen der Milchcitrat-Boullion Fermentation.....	XXII
VII Sequenzen.....	XXIII
VII.1 Sanger-Sequenzierung.....	XXIII
VII.2 <i>Full-Plasmid</i> Sequenzierung.....	LIII
Danksagung.....	CCIX
Eidesstaatliche Versicherung.....	CCX

IV Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BHI	<i>Brain-Heart-Infusion</i> , Hirn-Herz-Infusion
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , Programm zur lokalen Sequenzähnlichkeitssuche
CEP	<i>Cell enveloped proteinase</i> , extrazelluläre Proteinase
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> , kurze palindromische DNA-Abschnitte
DAP	Diaminopimelinsäure
dCas9	<i>death Cas9</i> , katalytisch inaktives Cas9
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> , doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dso	<i>double stranded origin</i> , doppelsträngiger Ursprung
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Exp	exponentiell
GC	Guanin-Cytosin
gDNA	genomische DNA
Gly	Glycin
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> , allgemein als sicher anerkannt
HiFi	NEBuilder® HiFi DNA
HDR	<i>Homology directed repair</i> , Homologe-Rekombination
Ind	induziert
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KbE	Kolonie-bildende-Einheiten
LB	Luria-Bertani
MAMA	<i>mismatch amplification mutation assay</i> , Methode zum Nachweis spezifischer Punktmutationen
MCB	Milchcitrat-Boullion
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker
MMR	<i>mismatch repair</i> , Fehlbasenpaarungs-Reparatur
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , US-amerikanisches Zentrum für biologische Datenbanken
NEB	New England Biolabs
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> , Nicht-homologe Endverknüpfung
NICE	<i>nisin-controlled expression</i> , Nisin-kontrollierte Expression
NTC	<i>No template control</i> , Negativkontrolle ohne DNA
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm

IV Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ori	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i> , Protospacer-angrenzendes Motiv
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
Phusion™	Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase
pRNA	Primer RNA
RCR	<i>Rolling Circle Replicating</i> , Replikationsmechanismus zirkulärer DNA
Rpm	<i>Rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rSAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sgRNA	<i>single guide RNA</i> , Einzel-Guide RNA
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> , einzelsträngige DNA
sso	<i>single stranded origin</i> , einzelsträngiger Ursprung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tm	Schmelztemperatur
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜK	Übernachtskultur
Uv.	Unverdünnt
VE	vollentsalzt
Wt/v	<i>Weight/volume</i> , Gewicht/Volumen
X-Gal	X-β-Gal

V Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das proteolytische System von <i>Lactococcus</i> spp. nach Savijoki et al. (2006) .	6
Abbildung 2: Modell des Replikationsmechanismus eines RCR-Plasmids nach Ruiz-Masó et al. (2015)	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der DNA-Replikationsgabel nach Thomason et al. (2014).....	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung von CRISPR-Cas9	21
Abbildung 5: Ablaufschema der in dieser Arbeit angewendeten Methoden zur Bearbeitung der Problemstellung	27
Abbildung 6: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR der Transformanten der Ligation von pCas9, p428.1D und p428.25A mit pTRKH2.....	76
Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese der Cas9-Insert PCR.	77
Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese der PCR, um das gesamte Insert auf pTRCas9 nach Restriktion nachzuweisen	78
Abbildung 9: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zum Nachweis von pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop	79
Abbildung 10: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR von <i>L. cremoris</i> NZ9000 pTRCas9 und <i>E. coli</i> DH5 α pTRCas9 mit Phusion™ und Taq DNA-Polymerase	81
Abbildung 11: Agarose-Gelelektrophorese zur Amplifikation des <i>recT</i> -Gens.	82
Abbildung 12: Agarose-Gelelektrophorese der Plasmidlösungen der Transformanten von <i>L. cremoris</i> NZ9000 pNZrecTLR.....	83
Abbildung 13: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis eines Inserts und des Xylose Promotors in pZ8048.....	85
Abbildung 14: Agarose-Gelelektrophorese zur Herstellung von pNZrecTGV	88
Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese der Hitzeschock Transformation von pTRCas9.25A und pTRKH2 in <i>E. coli</i> WM3064.....	90
Abbildung 16: Agarose-Gelelektrophorese der MAMAPCRvrs0 PCR der potenziellen Transformanten des <i>L. cremoris</i> LTH 7122	92
Abbildung 17: Agarose-Gelelektrophorese der PCR zur Überprüfung der potenziellen Transformanten von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 aus der MAMAvrs0 PCR des dsDNA Glycin Versuchs, sowie die optimierte MAMAvrs1 PCR an Klon 1-4 von <i>L. cremoris</i> LTH7122 dsDNA Glycin Versuchs.	93
Abbildung 18: Agarose-Gelelektrophorese der MAMA-PCR des Ansatzes X der potenziellen Transformanten von <i>L. lactis</i> LTH 7123.....	94
Abbildung 19: Ausschnitt des <i>prtP</i> -Gens erzeugt mit SnapGene®.	94
Abbildung 20: Agarose-Gelelektrophorese der MAMA-PCR der potenziellen Transformanten von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 mit MAMAvrs1 und MAMAvrs2.	96

Abbildung 21: Agarose-Gelelektrophorese der MAMA-PCR MAMAvrs2 der potenziellen Transformanten von <i>L. cremoris</i> LTH 7122.	97
Abbildung 22: Agarose-Gelelektrophorese der PCR zur Überprüfung der Mutation des <i>codY</i> -Gens der pTRCas9codY3 Klone..	104
Abbildung 23: SDS-PAGE Gele des A) Pellets B) Überstandes der Xylose-Induzierung von <i>L. cremoris</i> NZ9000 pNZrecTGV im Vergleich zu nicht induzierten Zellen aus M17 und GM17 Medium.	106
Abbildung 24: Gel der SDS-PAGE Gele des A) Pellets B) Überstandes der Nisin-Induzierung von <i>L. cremoris</i> NZ9000 pNZrecTLR oder <i>L. cremoris</i> NZ9000 pNZrecTPG im Vergleich zu nicht induzierten Zellen.....	106
Abbildung 25: Pan-Genom-Analyse von 42 <i>L. cremoris</i> Stämmen.....	109
Abbildung 26: Pan-Genom-Analyse von 95 <i>L. lactis</i> Stämmen	110
Abbildung 27: Plasmidkarte des Plasmids pTRCas9	XIII
Abbildung 28: Plasmidkarte des Plasmids pNZrecTLR.....	XIV
Abbildung 29: Plasmidkarte des Plasmids pNZrecTPG	XV
Abbildung 30: Plasmidkarte des Plasmids pNZrecTGV	XVI
Abbildung 31: Agarose-Gelelektrophorese der Plasmidlösungen der positiven Transformaten von pCas9 mit <i>Spacer</i> 1D217 und 2D217.....	XVII
Abbildung 32: Agarose-Gelelektrophorese der <i>Cas9-Insert</i> PCR auf pTRKH2 mit <i>Spacer</i> oppDBind1	XVII
Abbildung 33: Agarose-Gelelektrophorese der <i>recT-Insert</i> PCR der HiFi-Assembly Klone	XVIII
Abbildung 34: Agarose-Gelelektrophorese der A51/A52 PCR von <i>L. lactis</i> LTH 3882. ...	XVIII
Abbildung 35: Agarose-Gelelektrophorese der PCR mittels <i>Taq</i> DNA-Polymerase des Xylose Promotor mit Klonierungs-Primern.....	XVIII
Abbildung 36: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zum Nachweis der Transformation von pNZ8048 in <i>L. cremoris</i> LTH 7122 und <i>L. lactis</i> LTH 7123	XIX
Abbildung 37: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zum Nachweis der Transformation von pTRKH2 in <i>L. lactis</i> LTH 7123.	XIX
Abbildung 38: Agarose-Gelelektrophorese der A) MAMAvrs4 PCR von <i>L. lactis</i> LTH 7123 und B) MAMAvrs1.1 PCR von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 in XSM17 und XM17.....	XX
Abbildung 39: Gel der Agarose-Gelelektrophorese der MAMA-PCR der pTRCas9oppDBind1 gepoolten Klone..	XX
Abbildung 40: Ausschnitt des Sequenzierergebnisses der ab.-Datei eines Berlec long-Klon	XXI

VI Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Plasmidklassen für die Genom-Editierung in <i>Lactococcus</i> spp.....	15
Tabelle 2: Antibiotika, mit Konzentrationen, die in dieser Arbeit verwendet wurden	28
Tabelle 3: Zusammensetzung der Puffer und Stammlösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.	28
Tabelle 4: Medien, die in dieser Arbeit verwendet wurden	30
Tabelle 5: Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.	31
Tabelle 6: Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet, oder hergestellt wurden.	31
Tabelle 7: Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden.	33
Tabelle 8: <i>Spacer</i> für die CRISPR-Cas9 Kasette, die in dieser Arbeit verwendet wurden. .	35
Tabelle 9: Reparatur-Templates, die in dieser Arbeit verwendet wurden	36
Tabelle 10: Elektroporationsansätze zur Ligation der <i>Spacer</i> auf pCas9	43
Tabelle 11: PCR Programm zur Amplifikation der CRISPR-Cas9 Kasette von pCas9.....	44
Tabelle 12: Ligationsansätze der Amplifikate des p428.25A und des p428.1D zur Klonierung in pTRKH2.....	45
Tabelle 13: PCR Programm zum Nachweis der CRISPR-Cas9 Kasette auf pTRKH2.	45
Tabelle 14: PCR Programm der Cas9- <i>Insert</i> PCR, um CRISPR-Cas9 <i>Insert</i> auf pTRKH2 nachzuweisen mit <i>Taq</i> DNA-Polymerase.....	46
Tabelle 15: PCR Programm zum Nachweis des Reparatur-Template auf pTRCas9.25A.....	47
Tabelle 16: PCR Programm zum Nachweis der CRISPR-Cas9 Kasette auf pTRKH2 mit dem Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix.....	48
Tabelle 17: PCR Programm zum Nachweis der gesamten CRISPR-Cas9 Kasette auf pTRKH2	49
Tabelle 18: PCR Programm zum Nachweis der Transformation von pTRKH2	50
Tabelle 19: PCR Programm zum 16S-rRNA Nachweis.....	51
Tabelle 20: PCR Programm zur Amplifikation des <i>recT</i> -Gens von <i>E. faecalis</i> ATCC14506 .	52
Tabelle 21: PCR Programm zur Amplifikation des <i>recT</i> - Gens von <i>E. faecalis</i> ATCC14506 mit Klonierungs-Primern.....	53
Tabelle 22: PCR Programm zur Amplifikation des pNZ8048 Rückgrats für das HiFi-Assembly.	54
Tabelle 23: PCR Programm zur Amplifikation des <i>recT</i> -Gens vom pNZrecTLR für das HiFi-Assembly.....	54
Tabelle 24: PCR Programm zur Amplifikation des <i>recT</i> -Gens auf pNZ8048 zur Bestätigung der Entfernung überschüssiger DNA-Sequenz durch das HiFi-Assembly	55
Tabelle 25: Wachstumsbedingungen der zugehörigen Plasmidtransformationen	56
Tabelle 26: PCR Programm zum Nachweis des Cas9- <i>Insert</i> auf pTRKH2.....	56
Tabelle 27: PCR Programm zum Nachweis von pNZ8048.....	57

Tabelle 28: PCR Programm zur Amplifikation des Xylose Promotors von <i>L. lactis</i> LTH 3882 mittels Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix.....	58
Tabelle 29: PCR Programm zur Amplifikation des Xylose Promotors mit Klonierungs-Primern und Q5® High-Fidelity-Polymerase	58
Tabelle 30: PCR Programm zur Amplifikation des Xylose Promotors mit <i>Taq</i> DNA-Polymerase	59
Tabelle 31: PCR Programm der Kolonie-PCR zum Screening des pNZrecTGV	60
Tabelle 32: PCR Programm zum Nachweis von Xylose Promotor auf pNZrecTGV	60
Tabelle 33: PCR Programm zum Nachweis von pNZrecTGV	61
Tabelle 34: Xylose-Ansätze der verwendeten Zellen und Programme der MAMA-PCR.....	63
Tabelle 35: PCR Programm der MAMAvrs0 PCR	64
Tabelle 36: PCR Programm zur Überprüfung der Mutation für positive Klone der MAMAvrs0 PCR	64
Tabelle 37: PCR Programm der MAMAvrs1 PCR	65
Tabelle 38: PCR Programm der MAMAvrs1.1 PCR.	65
Tabelle 39: PCR Programm der MAMAvrs2 PCR	66
Tabelle 40: PCR Programm der MAMAvrs3 PCR	66
Tabelle 41: PCR Programm der MAMAvrs4 PCR	67
Tabelle 42: PCR Programm der MAMAvrs4.1 PCR.	67
Tabelle 43: PCR Programm der MAAMvrs4.2 PCR	67
Tabelle 44: Elektroporationsansätze zur Erstellung CRISPR-Cas9-basierter Mutationen des <i>prtP</i> -Gens in Starterkulturstämmen.	68
Tabelle 45: Elektroporationsansätze Xylose induzierter Starterkulturen mit pTRCas9-Derivaten und pTRKH2.	68
Tabelle 46: Elektroporationsversuche zur CRISPR-Cas9-basierten Mutation von <i>L. cremoris</i> NZ9000 mit verschiedenen Plasmiden und Reparatur-Templates.	70
Tabelle 47: PCR Programm für MAMA-PCR zum Nachweis CRISPR-Cas9-basierte Mutationen der <i>oppD</i> Bindestelle in <i>L. cremoris</i> NZ9000.	70
Tabelle 48: PCR Programm zum Nachweis CRISPR-Cas9-basierte Mutationen der <i>oppD</i> Bindestelle in <i>L. cremoris</i> NZ9000.	71
Tabelle 49: PCR Programm zum Nachweis CRISPR-Cas9-basierte Mutationen des <i>gal</i> -Gens in <i>L. cremoris</i> NZ9000.	71
Tabelle 50: PCR Programm zum Nachweis CRISPR-Cas9-basierte Mutationen des <i>codY</i> -Gens in <i>L. cremoris</i> NZ9000.....	72
Tabelle 51: PCR Programm zum Nachweis des <i>recT</i> -Gens auf pNZrecTLR und pNZrecTPG	73
Tabelle 52: Transformanten der <i>Spacer</i> Klonierung auf pCas9 in <i>E. coli</i> DH5α.	74

Tabelle 53: Transformanten der Ligation der CRISPR-Cas9 Kasette mit <i>Spacern</i> mit dem pTRKH2 Rückgrat.	75
Tabelle 54: Transformanten der pTRCas9PstI Herstellung.	77
Tabelle 55: Transformanten der Ligation des pTRCas9.25A mit den Reparatur-Templates Stop und Gly.	79
Tabelle 56: Übersicht zur Anzahl der positiven Transformanten zur Erstellung der pTRCas9 Vektoren.	80
Tabelle 57: Transformanten von <i>L. cremoris</i> NZ9000 der Ligation des pNZ8048 mit dem <i>recT</i> -Gen.	82
Tabelle 58: Transformanten von <i>L. cremoris</i> NZ9000 des HiFi-Assemblys zur Herstellung des pNZrecTPG.	83
Tabelle 59: Transformanten von <i>L. cremoris</i> NZ9000 der Ligation des Xylose-Promotors mit pNZrecTLR.	84
Tabelle 60: Transformanten von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 und <i>L. lactis</i> LTH 7123 nach Elektroporation mit verschiedenen Plasmiden und Plasmidmengen.	86
Tabelle 61: Mittelwert und angepasste Standardabweichungen der OD ₆₀₀ Messungen in Abhängigkeit von Glycin der ÜKs der Stämme <i>L. cremoris</i> LTH 7122 und <i>L. lactis</i> LTH 7123.	87
Tabelle 62: Transformanten von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 und <i>L. lactis</i> LTH 7123 nach Elektroporation mit pNZrecTGV.	87
Tabelle 63: Transformanten von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 und des <i>L. lactis</i> LTH 7123 bei verschiedenen Glycingehalten nach Elektroporation von pTRKH2 und dessen Derivaten. ...	89
Tabelle 64: Potenzielle Transformanten nach Xylose-Induzierung mit einzelsträngigem Reparatur-Template.	91
Tabelle 65: Ergebnisse der Gelelektrophorese mit verschiedenen Primer Kombinationen für <i>L. lactis</i> LTH 7123.	95
Tabelle 66: Primerkombinationen und -konzentrationen der MAMA-PCR von <i>L. cremoris</i> LTH 7122.	98
Tabelle 67: Transformanten von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 und des <i>L. lactis</i> LTH 7123 nach Xylose-Induzierung und pTRCas9.25A Elektroporation.	99
Tabelle 68: Transformanten von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 und <i>L. lactis</i> LTH 7123 nach Xylose-Induzierung und Elektroporation verschiedener Plasmide und Plasmidmengen.	100
Tabelle 69: Relative Transformationseffizienzen verschiedener Plasmide in <i>L. cremoris</i> LTH 7122 und <i>L. lactis</i> LTH 7123.	101
Tabelle 70: Transformanten der verschiedenen Induzierungsmethoden bei Elektroporation mit entsprechendem Reparatur-Template (Rep)	102

Tabelle 71: Transformanten des <i>L. cremoris</i> NZ900 mit OD ₆₀₀ 0,83 und OD ₆₀₀ 1,75 nach Transformation des pTRCas9codY3 mit entsprechendem Reparatur-Template (Rep) in Zellen die mittels Induzierung nach Guo et al. hergestellt wurden.....	103
Tabelle 72: Vergleich der Transformanten von <i>L. cremoris</i> NZ9000 mit verschiedenen CRISPR-Cas9 Vektoren, sowie mit und ohne Reparatur-Template	105
Tabelle 73: Keimzahl als Log10 der KbE der verschiedenen Mutanten von <i>L. cremoris</i> NZ900 in MCB	107
Tabelle 74: Komplet-Genom der Starterkulturstämme <i>L. cremoris</i> LTH7122 und <i>L. lactis</i> LTH 7123 nach Chromosom und Plasmidgröße in bp	108
Tabelle 75: Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS.....	I
Tabelle 76: Verwendete Reagenzien und Hersteller	V
Tabelle 77: Verwendete Kits und Hersteller	VI
Tabelle 78: Verwendete Geräte und Hersteller	VII
Tabelle 79: Zusammensetzung der PCR-Ansätze bei Verwendung der <i>Taq</i> DNA-Polymerase	X
Tabelle 80: Zusammensetzung der PCR-Ansätze bei Verwendung der Q5® High-Fidelity-Polymerase	X
Tabelle 81: Zusammensetzung der PCR-Ansätze bei Verwendung des Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix	X
Tabelle 82: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele.....	XI
Tabelle 83: Koloniezahlen zur Fermentation in MCB	XXII
Tabelle 84: Sequenzen der Ligationsansätze der Klonierung der <i>Spacer</i> auf pCas9	XXIII
Tabelle 85: Sequenzen der Plasmidisolate zur Herstellung von pTRCas9.25A	XXVI
Tabelle 86: Sequenz des B9 und B10 Screenings der CRISPR-Cas9 Kasette ohne <i>Spacer</i> auf pTRKH2	XXVIII
Tabelle 87: Sequenz der Herstellung von pTRCas9 aus pTRCas9PstI.....	XXX
Tabelle 88: Sequenz der <i>Spacer</i> CodY3, CodYLR und oppDBind2 auf pTRCas9	XXX
Tabelle 89: Sequenz des Reparatur-Templates auf pTRCas9.25A.....	XXXII
Tabelle 90: Sequenz der Amplifikation des Xylose Promotors von <i>L. lactis</i> LTH 3882 mit Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix.....	XXXIII
Tabelle 91: Sequenz der Amplifikation des <i>recT</i> -Gens von <i>E. faecalis</i> ATCC14506 mit Q5® High-Fidelity-Polymerase	XXXIII
Tabelle 92: Sequenzen der Klone des HiFi-Assemblys zur Herstellung von pNZrecTPG	XXXIV
Tabelle 93: Sequenz der Amplifikation des Xylose-Promotors mittels <i>Taq</i> DNA-Polymerase	XXXVI
Tabelle 94: Sequenzen von pNZrecTGV zur Amplifikation des Xylose Promotors	XXXVI

Tabelle 95: Sequenz der 16S-rRNA der biologischen Masse nach Konjugation	XXXVII
Tabelle 96: Sequenz der PCR zur Überprüfung der Mutation der potenziell positiven Transformanten von <i>L. cremoris</i> LTH 7122	XXXVIII
Tabelle 97: Sequenz der PCR zur Überprüfung der Mutation von <i>L. lactis</i> LTH 7123 des Klons M3X.....	XXXIX
Tabelle 98: Sequenzen der PCR zur Überprüfung der Mutation von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 der Klone XM17.1 und XM17.2.....	XXXIX
Tabelle 99: Sequenzen der PCR zur Überprüfung der Mutation von <i>L. cremoris</i> LTH 7122 der Klone 8.11 und 27.11	XL
Tabelle 100: Sequenzen der PCR potenzieller <i>L. cremoris</i> NZ9000*gal Klone, die mit dem Verfahren nach Guo et al. und Berlec et al. hergestellt wurden	XLI
Tabelle 101: Sequenzen der PCR potenzieller <i>L. cremoris</i> NZ9000*oppDBind1 Klone, die mit dem Verfahren nach Guo et al. und Berlec et al. hergestellt wurden	XLIII
Tabelle 102: Sequenzen der PCR potenzieller <i>L. cremoris</i> NZ9000*oppDBind1 Klone....	XLIV
Tabelle 103: Sequenzen der PCR potenzieller <i>L. cremoris</i> NZ9000*codY Klone, die mit pTRCas9codY3 transformiert worden sind	XLVII
Tabelle 104: Sequenzen der PCR potenzieller <i>L. cremoris</i> NZ9000*oppDBind Klone, die mit pTRCas9oppDBind2 transformiert worden sind.....	XLIX
Tabelle 105: Sequenzen der PCR potenzieller <i>L. cremoris</i> NZ9000*codY Klone, die mit pTRCas9codYLR transformiert worden sind.....	LII
Tabelle 106: Sequenzen zum Nachweis des Stop-Codons auf pNZrecTPG und pNZrecTLR	LII
Tabelle 107: <i>Full-Plasmid</i> Sequenz von pTRCas9PstI.....	LIII
Tabelle 108: <i>Full-Plasmid</i> Sequenz von pTRCas9.25A.....	LVIII
Tabelle 109: <i>Full-Plasmid</i> Sequenz von pTRCas9codYLR	LXIII
Tabelle 110: <i>Full-Plasmid</i> Sequenz von pNZrecTLR	LXVIII

1 Zusammenfassung

Durch Fermentation von High-Protein Milchprodukten mit *Lactococcus* spp. können Peptide entstehen, die zu einem bitteren Fehlgeschmack führen. Es ist unklar, inwieweit die Enzyme des proteolytischen Systems dafür verantwortlich sind. Bei Fermentation mit PrtP-positiven Stämmen entstehen Bitterpeptide, wobei dies bei PrtP-negativen Stämmen nicht beobachtet werden konnte. Starterkulturstämme, die zur Fermentation eingesetzt werden, enthalten eine Vielzahl endogener Plasmide. Die Gene der Proteine des proteolytischen Systems sind auf diesen Plasmiden und chromosomal kodiert. Die Untersuchung von Mutanten im Vergleich zu ihren Wildtypen ist von besonderem Interesse, um herauszufinden, welche Gene, die für Proteine des proteolytischen Systems kodieren, zur Entstehung von Bitterpeptiden beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein System entworfen, welches sich zur Punktmutation der chromosomal kodierenden Gene des proteolytischen Systems in Nisin induzierbaren Stämmen anwenden lässt. Das Zwei-Plasmid System beruht dabei auf einer Rekombinase, die über eine Reparaturvorlage (auch Reparatur-Template genannt) die gewünschte Mutation einbaut, und einem CRISPR-Cas9 Plasmid, das durch Mutation der PAM-Sequenz als Gegenselektionsmittel genutzt werden kann. Durch dieses System konnten erfolgreich Mutationen von *codY*, eines Transkriptionsregulators, und der CodY Bindestelle vor dem *oppD*-Gen, einem Transporter des proteolytischen System, eingebaut werden. Eine Veränderung der Wachstumsrate der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in Milchsäurebouillon konnte nicht festgestellt werden.

Des Weiteren wurde ein Einzel-Plasmid System mit einem Xylose Promotor entworfen, um unabhängig von einer Nisin induzierten Expression zu sein. Mit diesem System sollte an der Aminosäure Serin der katalytischen Triade des PrtP der beiden Starterkulturstämme *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 eine Punktmutation eingebaut werden, sodass an dieser Position die Aminosäure Alanin, Glycin oder ein Stopcodon vorliegen. Durch Screening über MAMA-PCR sollte eine mögliche Mutation erkannt werden und somit der Screeningaufwand durch Sequenzierung möglichst gering gehalten werden. Es konnte keine Mutation durch das Xylose-System erzeugt werden, da durch Testung verschiedener Parameter der Transformation und MAMA-PCR ausgeschlossen werden konnte, dass aufgrund dessen die Mutation in den Starterkulturstämmen nicht erfolgreich war. Durch SDS-PAGE Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass bei Xylose-Induzierung keine Überexpression der Rekombinase erfolgt. Somit ist vermutlich eine Induzierung mittels Xylose in milchassoziierten *Lactococcus* spp. Stämmen nicht möglich.

Die Transformierbarkeit der beiden Starterkulturstämme wurde untersucht, indem versucht wurde, den pTRCas9 Vektor, welcher eine CRISPR-Cas9 Kasette trägt, und dessen Derivate

über Elektroporation oder Konjugation in die Stämme einzubringen. Es ist festzustellen, dass eine Transformation des CRISPR-Cas9 Vektors unter den in dieser Arbeit angewendeten Methoden nicht möglich ist. Dies liegt vermutlich weder an dem Replikationsursprung, an der verwendeten Menge Plasmid, noch an den getesteten optischen Dichten. Stammspezifische Eigenschaften sind wahrscheinlich ausschlaggebend für die Transformationseffizienz bestimmter Plasmide. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass Transformationseffizienzen der Starterkulturstämme der Spezies *Lactococcus* spp. nicht der Transformationseffizienz des bekannten Stammes *L. cremoris* NZ9000 entsprechen. Von den verwendeten Replikons konnten nur zwei mit großer Transformationseffizienz in die Starterkulturstämme eingebracht werden. Es müssen weitere Untersuchungen erfolgen, um festzustellen, ob dies aufgrund der Größe des Plasmids nicht möglich war, oder aufgrund des CRISPR-Cas9 induzierten Doppelstrangbruchs. Es gilt weitere Forschung mit der Fragestellung anzustoßen, wieso Starterkulturstämme, die endogene Plasmide tragen, manche Vektoren eher aufnehmen als andere. Ein möglicher Einflussfaktor sind die Inkompatibilitätsgruppen der Plasmidklassen, da diese die stabile Koexistenz exogener und endogener Plasmide limitieren können. Weitere Untersuchungen abseits der klassischen Überprüfungen (Rückgrat, Plasmidmenge, optische Dichte) sind notwendig. Bei erfolgreicher Transformation lassen sich mit dem entwickelten CRISPR-Cas9 System Mutationsraten von 75 % bei chromosomal kodierten Genen erzeugen. Zur Mutation von plasmidkodierten Genen, wie dem *prtP*, mittels des in dieser Arbeit entwickelten Systems, ist weitere Forschung nötig.

2 Abstract

Fermentation of high-protein products with *Lactococcus* spp. can produce peptides that lead to a bitter off-flavor. It is unclear to what extent the enzymes of the proteolytic system are responsible for this outcome. Fermentation with PrtP-positive strains produces bitter peptides, whereas this was not observed with PrtP-negative strains. Starter culture strains used for fermentation contain a variety of endogenous plasmids. The genes of the proteolytic system are encoded on these plasmids or on the chromosome. The investigation The study of mutants in comparison to their wild types is of particular interest in determining which genes encoding proteins of the proteolytic system contribute to the formation of bitter peptides.

In this study, a system was designed that can be used for point mutation of the chromosomally encoded genes of the proteolytic system in nisin-inducible strains. The two-plasmid system is based on a recombinase, which incorporates the desired mutation via a repair template, and a CRISPR-Cas9 plasmid, which can be used as a counter-selection agent by mutating the PAM sequence. This system was used to successfully incorporate mutations of *codY*, a transcription regulator, and the CodY binding site upstream of the *oppD* gene, a transporter of the proteolytic system. No change in the growth rate of the mutants compared to the wild type in milk citrate broth was observed.

Furthermore, a single plasmid system with a xylose promoter was designed to be independent of nisin induced expression. This system was intended to introduce a point mutation at the amino acid serine of the catalytic triad of PrtP in the two starter culture strains *L. cremoris* LTH 7122 and *L. lactis* LTH 7123, so that the amino acid alanine, glycine, or a stop codon would be present at this position. Screening via MAMA-PCR was intended to detect a possible mutation and thus keep the screening effort via sequencing as low as possible. No mutation could be generated by the xylose system, as testing of various parameters of the transformation and MAMA-PCR ruled out the possibility that this was the reason for the unsuccessful mutation in the starter culture strains. SDS-PAGE gel electrophoresis showed that xylose induction does not result in overexpression of the recombinase. Thus, induction by xylose is presumably not possible in milk-associated *Lactococcus* spp. strains.

The transformability of the two starter culture strains was investigated by attempting to introduce the pTRCas9 vector, which carries a CRISPR-Cas9 cassette, and its derivatives into the strains via electroporation or conjugation. It should be noted that transformation of the CRISPR-Cas9 vector is not possible using the methods applied in this study. This is probably not due to the replication origin, the amount of plasmid used, or the optical densities tested. Moreover, strain-specific properties are likely to be decisive for the transformation efficiency of certain plasmids. The results obtained in this study show that the transformation efficiencies of the starter culture strains of the species *Lactococcus* spp. do not correspond to the

transformation efficiency of the known strain *L. cremoris* NZ9000. Of the replicons used, only two could be introduced into the starter culture strains with high transformation efficiency. Further investigations are needed to determine whether this was due to the size of the plasmid or due to the CRISPR-Cas9-induced double-strand break. Further research is needed to investigate why starter culture strains carrying endogenous plasmids take up some vectors more readily than others. One possible contributing factor is the incompatibility groups of plasmid classes, as these can limit the stable coexistence of exogenous and endogenous plasmids. Further investigations beyond the classic tests (backbone, plasmid quantity, optical density) are essential. If the transformation is successful, the CRISPR-Cas9 system developed can generate mutation rates of 75% in chromosomally encoded genes. Further research is needed to mutate plasmid-encoded genes, such as *prtP*, using the system developed in this study.

3 Einleitung und Kenntnisstand

3.1 Eigenschaften und taxonomische Einordnung von *Lactococcus* spp.

Milchsäurebakterien haben eine lange Tradition im Einsatz als Starterkulturen zur Fermentation von Lebensmitteln. Besonders ihre Verwendung als Starterkulturen in der Milchverarbeitung zu verschiedenen Produkten ist von ökonomischer Bedeutung (Savijoki et al., 2006). Stämme der Spezies *Lactococcus lactis* werden seit vielen Jahren als Starterkulturstämme in der Milchindustrie eingesetzt (Leroy & De Vuyst, 2004). *Lactococcus* spp. zählen zum Phylum *Bacillota* (früher: *Firmicutes*), zur Klasse *Bacilli*, zur Ordnung *Lactobacillales* und zur Familie *Streptococcaceae* (Ludwig et al., 2009; Oren & Garrity, 2021). Zu den Subspezies der Spezies *Lactococcus lactis* zählen *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L. lactis* subsp. *tructae* und *L. lactis* subsp. *cremoris*. Aufgrund der Änderung der taxonomischen Zuordnung von *L. lactis* subsp. *cremoris* zu *Lactococcus cremoris* (Li et al., 2021) ist mit der Bezeichnung *L. cremoris* in dieser Arbeit, die nach alter Taxonomie bezeichnete Subspezies *L. lactis* subsp. *cremoris* gemeint. Außerdem wurde *L. lactis* subsp. *tructae* zu *L. cremoris* subsp. *tructae* comb. nov. transferiert (Li et al., 2021). *Lactococcus* spp. liegen als kugel- oder eiförmige Zellen einzeln, in Paaren oder in Kette vor. Sie zählen zu den Gram-positiven Bakterien, die keine Endosporen bilden, unbeweglich, sowie fakultativ anaerob und Katalase negativ sind. *Lactococcus* spp. sind homofermentative Milchsäurebakterien und wandeln während des Wachstums in Milch Lactose zu Milchsäure um. Stämme der Spezies *Lactococcus* spp. verfügen über einen ungewöhnlich großen Bestand an endogenen Plasmiden (s. Abschnitt 3.3) (de Vos et al., 2009).

3.2 Das proteolytische System von *Lactococcus* spp.

Bei der Fermentation von Milch spielt das proteolytische System der Milchsäurebakterien eine entscheidende Rolle, da es den Zellen das Wachstum in Milch ermöglicht und gleichermaßen die Fermentation gewährleistet. Da die Milchsäurebakterien eine exogene Quelle für Aminosäuren oder Peptide benötigen, können sie das in der Milch vorhandene Kasein abbauen. Der Abbau des Kaseins und der Transport der Peptide in die Zelle erfolgt über Enzyme und Transporter des proteolytischen Systems: Hierzu zählen die extrazelluläre Proteinase, auch CEP (Englisch: *cell envelope proteinase*) genannt, um das Kasein abzubauen, die Peptid-Transporter, um die Peptide aus der Umgebung ins Innere der Zelle zu transportieren und die intrazellulären Peptidasen, die aus den Peptiden Aminosäuren freisetzen, die anschließend dem Metabolismus der Zelle zu Verfügung stehen. Fünf verschiedene Arten von CEPs konnten in Milchsäurebakterien charakterisiert werden. Im Fall von *L. lactis* und *L. cremoris* handelt es sich bei der vorhandenen CEP um PrtP (Savijoki et

al., 2006). Eine graphische Darstellung des proteolytischen Systems ist in Abbildung 1 zu sehen. Eine detaillierte Erläuterung der Abbildung 1 erfolgt im nächsten Abschnitt.

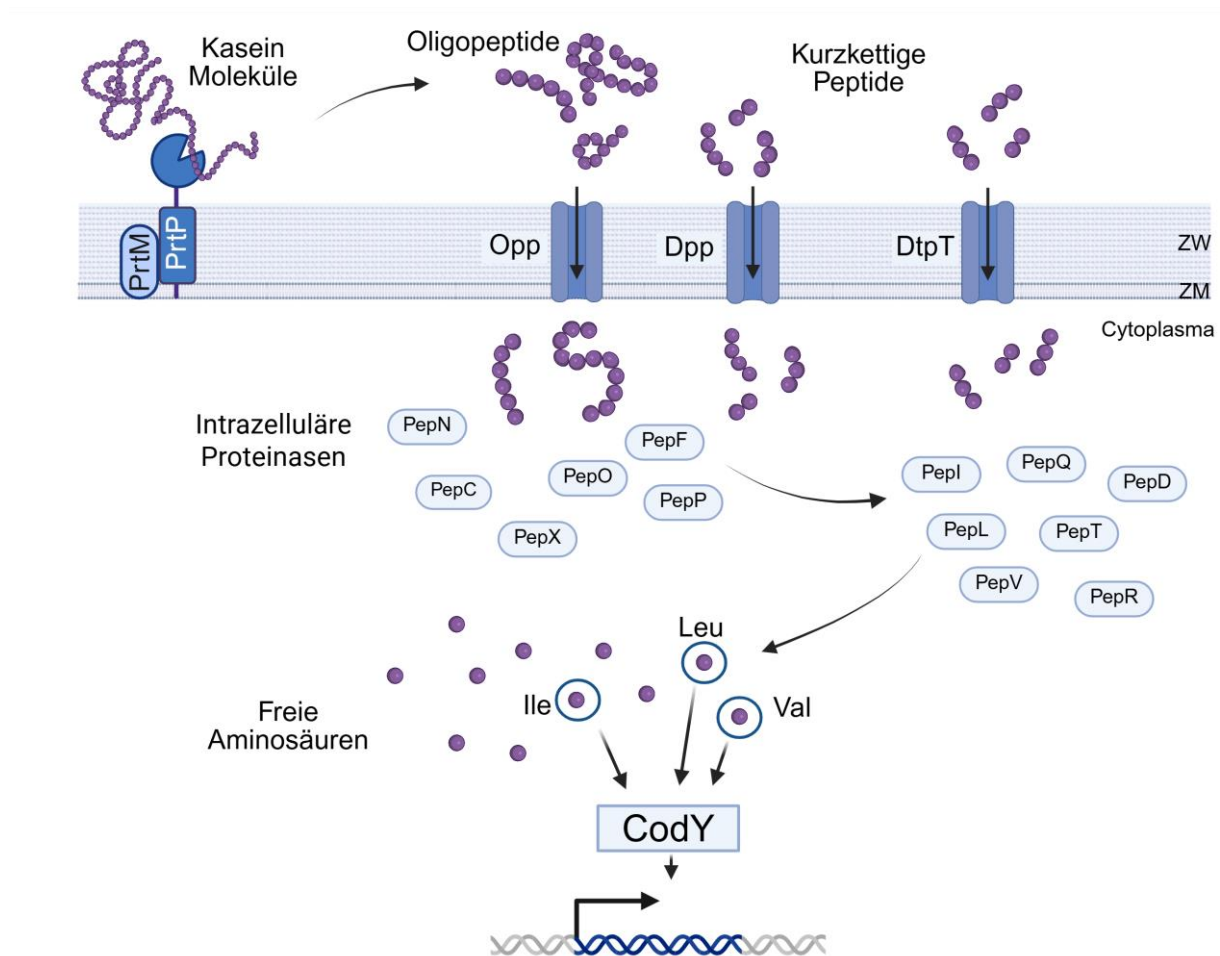


Abbildung 1: Das proteolytische System von *Lactococcus* spp. nach Savijoki et al. (2006). PrtP: extrazelluläre Proteinase, PrtM: Reifungsprotein, Opp Dpp DtpT: Peptidtransporter, CodY: Transkriptionsregulator. ZW: Zellwand, ZM: Zellmembran. PrtP schneidet das Kasein in Oligopeptide. Peptide mit einer Länge von 4-18 Aminosäuren werden von Opp ins Innere der Zelle transportiert. Peptide mit der Länge 2-4 Aminosäuren werden von Dpp und DtpT ins Innere der Zelle transportiert. Intrazelluläre Proteinasen bauen diese Peptide zu freien Aminosäuren ab. Der Transkriptionsregulator CodY erkennt den internen Pool verzweigter Aminosäuren (Isoleucin, Leucin und Valin) und unterdrückt die Expression von Genen des proteolytischen Systems. Erstellt mit BioRender.com.

3.2.1 Die Proteinase PrtP

Die extrazelluläre Proteinase bei *L. cremoris* und *L. lactis* ist PrtP. PrtP ist meist Plasmid kodiert, wurde aber auch schon chromosomal kodiert nachgewiesen (Savijoki et al., 2006). PrtP-Proteinase aus *Lactococcus* spp. sind zwischen 80-145 kDa groß und haben ein pH Optimum zwischen 5,5-6,5. Sie werden entweder aktiviert oder stabilisiert durch Ca^{2+} -Ionen, sind in der Zellwand lokalisiert und ragen nach außen (Kok, 1990). Das Plasmid pLP712, welches das *prtP*-Gen kodiert, kommt im *L. cremoris* Stamm NCDO712 in zweifacher Kopienzahl vor (Tarazanova et al., 2016). Da *Lactococcus* spp. Stämme auxotroph für verschiedene Aminosäuren sind, benötigen sie deswegen in Milch eine extrazelluläre Proteinase, um die Proteine der Milch abzubauen (Chopin, 1993; Christensen et al., 1999).

PrtP ist aus mehreren Domänen aufgebaut, wobei es wie die meisten Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen als Prä-Pro-Protein synthetisiert und anschließend durch die Zellmembran translokalisiert wird. Final wird es durch Trennung des Pro-Peptids aktiviert. Das Reifungsprotein PrtM ist für die Aktivierung erforderlich. Das *prtM*-Gen befindet sich direkt stromaufwärts des *prtP*-Gens. Auf das Pro-Peptid folgt die katalytische beziehungsweise Protease-Domäne. Die katalytische Domäne des CEP gehört zur Superfamilie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen. Hierbei folgen oft auf die N-terminale katalytische Domäne C-terminale Erweiterungen, wie bei PrtP weitere Domänen, wie zum Beispiel Transmembransegmente. Für Serinproteasen der Klasse Subtilisin-ähnliche Serinproteasen mit unbekannter dreidimensionaler Struktur können Vorhersagen bezüglich konservierter Aminosäurereste oder auch Calcium-Bindungsstellen gemacht werden (Siezen, 1999).

Die Aminosäurereste der katalytischen Triade des PrtPs befinden sich beim gereiften Protein an den Stellen Asp(D)-30, His(H)-94 und Ser(S)-433. Diese Aminosäuren sind konserviert (Vos et al., 1989). Im ungereiften Zustand entspricht dies den Aminosäuren D217, H281 und S620, der in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Sayers et al., 2025) veröffentlichten Sequenz des *prtP*-Gens (Vos, Simons, et al., 1989; Vos, Van Asseldonk, et al., 1989). Genetische Varianten des PrtP unterscheiden sich in ihrer Spezifität hinsichtlich des Abbaus von α_{S1} -, β - und κ -Kasein (Siezen, 1999). Generell lässt sich PrtP in zwei Gruppen einteilen: P_I -Proteinasen, welche ein Temperaturoptimum bei 4 °C haben und bevorzugt auf β -Kasein wirken, und P_{III} -Proteinasen, welche ein Temperaturoptimum bei 30 °C haben und α_{S1} - und β -Kasein abbauen und ein anderes elektrophoretisches Profil als der Typ P_I -Proteinase aus β -Kasein bilden. P_I -Proteinasen wurden beispielsweise als einziger Typ in *L. cremoris* Wg2 gefunden und P_{III} -Proteinasen in *L. cremoris* SK11. Mischtypen aus beiden Gruppen wurden in *L. lactis* NCDO 738 nachgewiesen (Mayo, 1994).

Durch Untersuchungen von Enzym-Isolaten aus 16 verschiedenen *L. lactis* Stämmen konnte gezeigt werden, dass es eine Spezifität bezüglich des α_{S1} -Kasein aus Käse gibt, sowie gegenüber chromogener Peptide. Somit konnten die 16 Stämme in sieben Gruppen eingeteilt werden, die sich aufgrund der Spezifität der Proteinase gegenüber dem α_{S1} -Kasein Fragment 1-23 ergeben (Exterkate et al., 1993; Savijoki et al., 2006). Aufgrund dessen wurde eine Hybrid-Proteinase aus dem *prtP*-Gen von *L. lactis* Wg2 und *L. cremoris* SK11 entworfen, indem größere Segmente ausgetauscht wurden, um zu untersuchen, welche der 44 von 1902 Aminosäuren, in denen sich die beiden PrtP-Sequenzen unterscheiden, ausschlaggebend für die Substratspezifität sind. Die Hybrid-Proteinase wurde anschließend in *L. cremoris* MG1363 kloniert. Mit dieser Proteinase konnten zwei Segmente identifiziert werden, die wesentlich zur Spaltungsspezifität gegenüber dem Kasein beitragen (Vos et al., 1991). Jedoch wurde bei dieser Studie nicht gezielt die Substratbinderegion mutiert. Daher wurden in einer weiteren

Untersuchung gezielt Mutationen an der Substratbinderegion durchgeführt. Hierbei wurde das *prtP*-Gen in den Vektor pNZ521 kloniert. Das Plasmid wurde in *L. cremoris* MG1363 transformiert. In der Studie wurde Ser-433 durch eine Einzelbasen-Mutation in Alanin mutiert. Die Mutationen zeigten, dass Ser-433 die aktive Aminosäure ist und dass die Aminosäurereste 186 und 166 auf der gegenüberliegenden Seite der Bindestelle eine wichtige Rolle bei der Substratspezifität spielen, insbesondere wenn diese Aminosäurereste und das Substrat entgegengesetzt geladen sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Mutante S433A in Milch nicht wächst. Die Ergebnisse zeigten, dass mehrere mutierte SK11-Proteinasen neuartige Eigenschaften aufwiesen, die bei natürlichen Varianten nicht beobachtet werden konnten. So führte der Austausch der Aminosäuren an Position 137-139 (Ala-Lys-Thr) zu Gly-Pro-Pro zu einer verringerten Aktivität und eingeschränkten Spezifität und zu Gly-Leu-Ala zu einer erhöhten Aktivität und breiteren Spezifität (Siezen et al., 1993). Der Fokus der Studie lag hauptsächlich auf den Unterschieden der beiden Proteinasen der Stämme *L. cremoris* SK11 und *L. cremoris* Wg2 sowie der Aktivität und der Spezifität der mutierten PrtP.

CEPs unterscheiden sich von Subtilisin-Proteasen durch die C-terminale Verlängerung, die das Enzym in der Zellmembran verankert. In den Subtilisin-Proteasen wurden vier Calcium-Bindestellen identifiziert. Die Assoziation von Ca^{2+} -Ionen mit diesen Stellen kann die Aktivität und thermische Stabilität des Enzyms beeinflussen. Die Produktion des katalytisch aktiven PrtPs in *Lactococcus* spp. hängt von der Anwesenheit von Calciumionen im Medium ab. Es ist fraglich, wie die katalytische Aktivität des PrtPs durch Ca^{2+} -Ionen erreicht wird: Entweder kann bereits die aktive Konformation nur eingenommen werden, wenn Ca^{2+} -Ionen im Faltungsprozess involviert sind, oder die aktive Konformation wird nach Faltung durch Ca^{2+} -Ionen stabilisiert. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens zwei Ca^{2+} -Ionen gebunden sein müssen, um die Aktivität des Enzyms aufrecht zu erhalten (Exterkate & Alting, 1999). Drei Calcium-Bindestellen konnten in CEPs vorhergesagt werden (Siezen et al., 1991). Beim Waschen von Zellen, die in Milch gewachsen sind, mit Calcium-freien Puffer verloren sie ihre Aktivität der CEP, die bei erneuter Zugabe der Ca^{2+} -Ionen wiederhergestellt werden konnte (Exterkate & Alting, 1999). Somit ist davon auszugehen, dass Calcium-Ionen eine wichtige Rolle bei der Aktivität von PrtP spielen. Hansen und Marcatili (2020) nehmen an, dass die Bakterienzelle sich an die Kaseinmizelle anlagert und somit das PrtP mit seiner Höhe von 40 nm in die Kaseinmizelle hineinragt, da dies einen metabolischen Vorteil bietet. Die Protease-Domäne wird so in einer Umgebung positioniert, die reich an Kasein-Substrat ist.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass besonders die Peptide des α_{S1} -Kaseins in einer Weise akkumulieren, die mit der Spezifität des PrtP der einzelnen Stämme übereinstimmt (Broadbent et al., 1998). Bei der Spaltung von Kasein durch PrtP können über 100 verschiedene Oligopeptide entstehen (Savijoki et al., 2006).

3.2.2 Transporter und Peptidasen

Weitere Bestandteile des proteolytischen Systems sind die Oligopeptid-Transporter (Englisch: *oligo peptide transporter*, Opp). Mittels des Opp-Systems werden die Peptide, die durch den Kasein-Abbau durch PrtP entstehen, in die Zelle transportiert (s. Abbildung 1). Dabei sind die Gene für OppA, OppB, OppC, OppD und OppF in einem Operon lokalisiert und bilden zusammen einen Komplex, über den Oligopeptide transportiert werden. Es ist bekannt, dass paraloge Gene für beispielsweise OppA existieren. Opp transportiert Peptide zwischen 4-18 Aminosäureresten (Savijoki et al., 2006).

Zu den weiteren Peptidtransportern gehören der protonengesteuerte Di- und Tripeptid Transporter DtpT und der ATP-gesteuerte Dpp (oder auch DtpP). Die beiden Transporter transportieren Di- und Tripeptide ins Innere der Zelle. Dpp kann neben Di- und Tripeptiden auch Tetrapeptide transportieren. Insbesondere Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten zeigen die höchste Affinität bezüglich Dpp. DtpT präferiert hingegen hydrophile Seitenketten und geladene Di- und Tripeptide (Savijoki et al., 2006).

Die Oligo-, Di- und Tripeptide, die ins Innere der Zelle transportiert werden, werden von intrazellulären Endopeptidasen, meistens Aminopeptidasen wie PepN und PepC, abgebaut. Neben diesen Endopeptidasen gibt es noch viele weitere Endopeptidasen, die an dem Abbau beteiligt sind (s. Abbildung 1) (Savijoki et al., 2006).

3.2.3 Der Transkriptionsregulator CodY

Die Expression einiger Gene, wie *prtP*, *opp*, *pepN* und *pepC*, des proteolytischen Systems wird durch den Transkriptionsregulator CodY als Antwort auf die Stickstoffverfügbarkeit reprimiert. CodY wird durch die Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin stimuliert (Guédon, Serror, et al., 2001; Kok et al., 2017). Das *opp*-Operon wird beispielsweise durch CodY reguliert. Insbesondere mit dem Promotor von *oppD* findet eine starke Interaktion statt (Den Hengst, Curley, et al., 2005). Dazu bindet CodY stromaufwärts an die Sequenz AATTTTCWGAAAATT. Außerdem reguliert CodY sich selbst, da diese Sequenz ebenfalls stromaufwärts des *codY*-Gens zu finden ist (Den Hengst, Van Hijum, et al., 2005). Als weiteres Motiv konnte AATWTTCTGACAATT, vorkommend in *L. lactis* F44, nachgewiesen werden (Wu et al., 2022).

3.2.4 Bitterpeptide in fermentierten Milchprodukten

Bei der traditionellen Herstellung von fermentierten Milchprodukten wie Frischkäse, Skyr oder Abtropfjoghurt entsteht Sauermolke als unerwünschtes Nebenprodukt. Durch den hohen Anteil an Milchsäure, unlöslichem Molkenprotein oder Mineralien ist diese schwer zu verarbeiten. Im Gegensatz dazu wird Süßmolkenpulver in einer Vielzahl von Produkten der Lebensmittelindustrie verwendet, wie Getränkpulver, Suppen, Backwaren, Süßwaren und

Eiscreme (Chandrapala et al., 2015; Forler et al., 2021; Konrad et al., 2012). Um Sauermolke bei der Produktion zu vermeiden und dem gesteigerten Interesse an High-Protein Milchprodukten, wie Skyr oder Quark (Proteingehalt >8 %), zu entsprechen (Forler et al., 2021; Shahbandeh, 2025a, 2025b), wurde in einem alternativen Verfahren die Milch durch Ultrafiltration auf den gewünschten Proteingehalt aufkonzentriert und anschließend fermentiert. Bei Produkten, die durch dieses Verfahren hergestellt wurden, konnten jedoch bittere Fehlgerüche nachgewiesen werden (Schäfer et al., 2019; Sebald et al., 2018).

Durch Herstellung des Cheddar-Käses mit einzelnen *L. lactis* Starterkulturstämmen konnte bereits vor Jahrzehnten gezeigt werden, dass die Auswahl des Starterkulturstammes signifikant die Bitterkeit des Käses beeinflusst (Broadbent et al., 1998). Bei Verwendung des alternativen Verfahrens, der Aufkonzentration und anschließender Fermentation, konnten Sebald et al. (2018) zeigen, dass Bitterpeptide auch bei Frischkäse mit 9 % und 12 % Protein-Anteil entstehen und sich somit das Problem des bitteren Geschmacks nicht nur auf gereifte Käse wie Cheddar bezieht. 17 Bitterpeptide konnten identifiziert werden. Als bitter wahrgenommen wurden insbesondere Peptide bestehend aus 18 bzw. 11 Aminosäureresten, die aus β - und κ -Kaseinabbau stammen (Sebald et al., 2018). Neben der erhöhten Bitterkeit des Produkts konnte ebenso eine Erhöhung der Konzentration der gelösten Calcium-Ionen bei Herstellung nach dem alternativen Verfahren festgestellt werden. Es konnte durch Reduktion des Calciumgehaltes des Retentats eine signifikante Reduktion der Bitterkeit von konzentriertem-fermentiertem Frischkäse erzeugt werden (Schäfer et al., 2019).

Dass die Proteolyse des Kaseins ausschlaggebend für die Entwicklung von Bitterpeptiden ist, ist bereits seit Jahrzehnten bekannt (Lemieux & Simard, 1992). Ebenso spielt PrtP bei der Geschmacksentwicklung während der Fermentation eine wichtige Rolle (Exterkate et al., 1993). In der Studie von Forler et al. (2021) wurde, beruhend auf den beschriebenen Ergebnissen, die Transkriptionsrate von PrtP bei einer erhöhten Proteinkonzentration und einem erhöhten Calciumgehalt untersucht. Der erhöhte Calciumgehalt wurde untersucht, weil der Kasein-gebundene Anteil des Calciums mit einem sinkendem pH-Wert in Milch (Koutina et al., 2014) von etwa 70 % auf etwa 3 % sinkt, wie es bei der Fermentation der Fall ist. Somit steigt der Anteil an freiem Calcium, was Einfluss auf die Calciumbindestellen des PrtP haben könnte. Bei leicht erhöhtem Calciumgehalt konnte eine erhöhte Transkription des *prtP*-Gens sowie eine erhöhte Aktivität des PrtP festgestellt werden. Wenn hohe Calciumkonzentrationen (50 mM statt 5 mM) eingesetzt wurden, wurde eine Abnahme der *prtP* Expression um über 50 % gemessen. Es konnte jedoch unter Verwendung des Stammes *L. cremoris* LTH 7122 in rekonstituiertem Kasein-Medium mit 3,4 % und 8,5 % Proteingehalt keine Korrelation zwischen der *prtP* Transkription und der Calcium- oder Proteinkonzentration hergestellt werden. Mittels einer sensorischen Bewertung konnte gezeigt werden, dass eiweißreicher

Friskäse, der mit *prtP*-positiven *L. lactis* oder *L. cremoris* Stämmen fermentiert wurde, bitter schmeckt, während bei Fermentation mit *prtP*-negativen Stämmen keine Bitterkeit festgestellt werden konnte (Forler et al., 2021). Es bleibt fraglich, inwieweit PrtP für den Gehalt an Bitterpeptiden in High-Protein-Produkten verantwortlich ist.

3.3 Plasmide in Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien tragen Plasmide, die stark in ihrer Größe und Anzahl variieren. So sind die Plasmide 0,87-250 kb groß und in einer Kopienanzahl von 1-100 in der Zelle vorhanden (Cui et al., 2015). *Lactococcus* spp. Stämme tragen generell verschiedene Plasmide, die in ihrer Größe von etwa 2 kb bis 200 kb variieren (Seegers et al., 1994). Die funktionellen Gene, die auf den Plasmiden kodiert sind, verleihen ihren Wirten einen Wettbewerbsvorteil gegenüber Zellen, die keine Plasmide tragen (Cui et al., 2015; Siezen et al., 2005). Die *Lactococcus* spp. Plasmide umfassen Gene die für Enzyme kodieren, die an der Verwertung von Laktose/Galaktose, der Proteolyse, dem Oligopeptidtransport, der Bakteriophagenresistenz, der Citratverwertung, der Bakteriozinproduktion und der Stressreaktion beteiligt sind. Viele der Plasmid-kodierten Gene haben Funktionen, die zuvor in *Lactococcus* spp. nicht gefunden wurden, und weisen einen deutlich unterschiedlichen Guanin-Cytosin (GC)-Gehalt auf. Diese Merkmale der Plasmid-kodierten Gene deuten auf eine kürzliche Übernahme durch horizontalen Gentransfer von anderen Milchorganismen wie Enterokokken, Streptokokken und Laktobazillen hin (Schroeter & Klaenhammer, 2009).

3.3.1 Rolling Circle Plasmide

Bei den beiden Varianten zur Replikation von Plasmiden in *Lactococcus* spp. wird zwischen den *Rolling Circle Replicating* (RCR) Plasmiden und den Theta-replizierenden Plasmiden unterschieden. RCR-Plasmide enthalten Replikationsinitiator-Proteine, sogenannte Rep, einen doppelsträngigen Ursprung (Englisch: *double stranded origin, dso*) und einen einzelsträngigen Ursprung (Englisch: *single stranded origin, sso*) (Kazi et al., 2022). RCR-Plasmide erreichen eine Größe von 846 bp bis 30 kb (Ruiz-Masó et al., 2015).

Der *Rolling Circle* Mechanismus wird von dem Plasmid kodierten Rep-Protein initiiert, das eine ortsspezifische Einkerbung auf dem Plusstrang im Bereich des *dso* erzeugt. Durch den Einschnitt wird ein 3'OH-Ende hinterlassen, das als Primer für die Leitstrang Synthese genutzt wird, an dem höchstwahrscheinlich die Replikationsproteine RepB und RepC des Wirts beteiligt sind. Die Elongation vom 3'OH-Ende verdrängt den Plusstrang bis das Replikosom den rekonstruierten *dso* erreicht und die Leitstrangreplikation endet. Das Endprodukt ist somit ein doppelsträngiges (Englisch: *double stranded, ds*) DNA-Molekül, das dem parentalen Minusstrang und dem neu synthetisierten Plusstrang entspricht und ein einzelsträngiges (Englisch: *single stranded, ss*) DNA-Zwischenprodukt, das dem parentalen Plusstrang entspricht. Abschließend wird der parentale Plusstrang durch die Wirtsproteine RNA-

Polymerase und DNA-Polymerase Pol I und Pol III, die am sso die DNA-Synthese initiieren, in eine dsDNA-Form umgewandelt. Im letzten Schritt findet die Verdrillung durch die Wirts-DNA Gyrase statt (del Solar et al., 1998). In Abbildung 2 ist der Mechanismus der *Rolling Circle*-Replikation schematisch dargestellt.

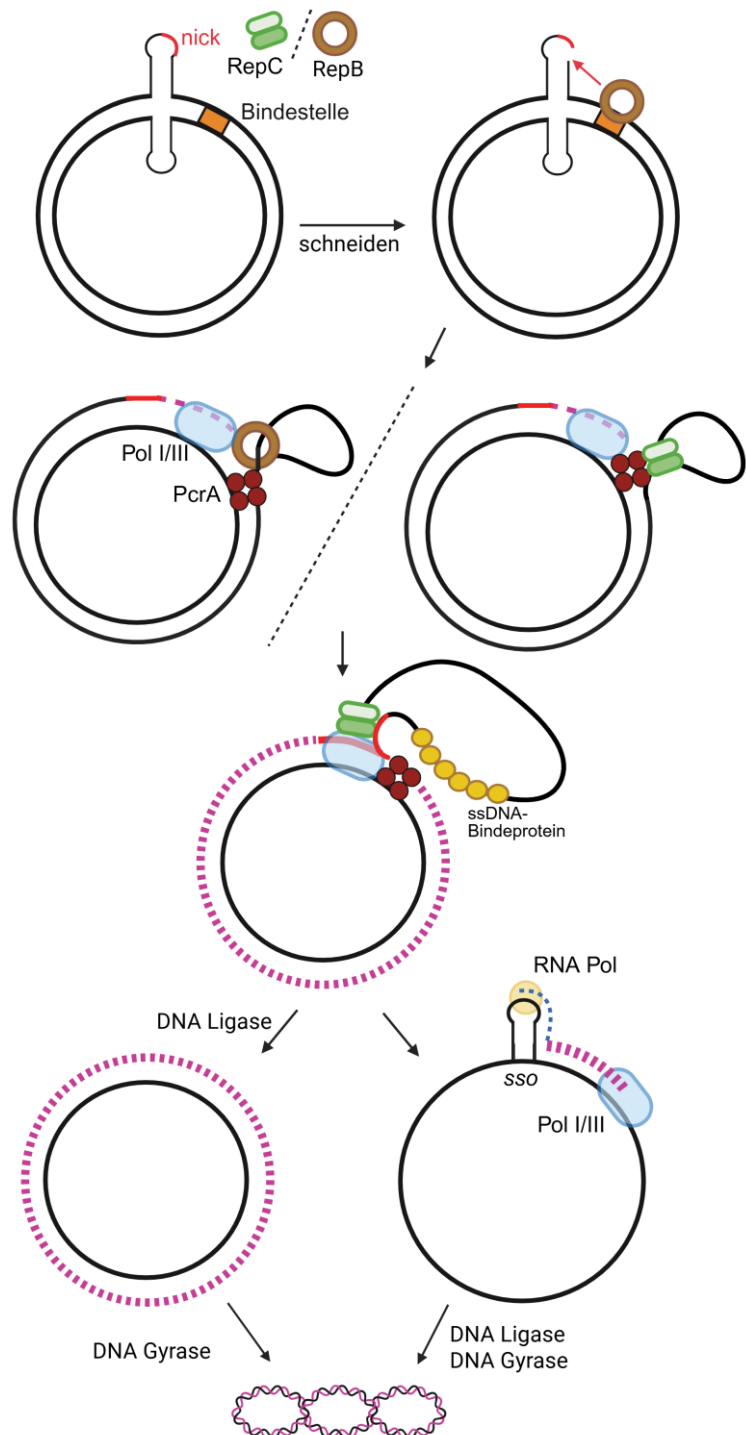


Abbildung 2: Modell des Replikationsmechanismus eines RCR-Plasmids nach Ruiz-Masó et al. (2015). RepB: Replikationsprotein B, Pol I/III: DNA-Polymerasen, PcrA: DNA-Helikase, RepC: Replikationsprotein C, RNA Pol: RNA-Polymerase. Der genaue Mechanismus ist im Text erklärt. Erstellt mit BioRender.com.

Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, kann nach der Spaltung an der Einkerbung (Englisch: *nick*) der hexamere Ring von RepB einen der Plasmidstränge umschließen. Die Verlängerung des

Leitstrangs erfolgt, wenn die parentale Doppelhelix durch die Wirts DNA-Helikase PcrA abgewickelt wird und der gespaltene Nicht-Matrizenstrang mit dem ssDNA-bindenden Protein bedeckt wird. Da die neu synthetisierte DNA kovalent an die parentale DNA gebunden ist, ist nach Beendigung einer Runde der Leitstrang-Replikation eine neue Spaltung an der *Nick*-Stelle erforderlich. Es wird angenommen, dass diese Reaktion durch dasselbe Rep-Molekül, das die Initiationsspaltung durchgeführt hat, katalysiert wird und während der Bewegung entlang der Replikationsgabel an das 5'-Ende des Elternstrangs gebunden bleibt. Anschließend findet eine Umesterung statt, die dieses 5'-Ende mit dem bei der Abschluss-Spaltung der DNA-Synthese freiwerdenden 3'-Ende verbindet, wobei der verdrängte parentale Strang als zirkuläre ssDNA freigesetzt wird. Dieses Zwischenprodukt dient als Vorlage für die Synthese des Folgestrangs. Der sso auf der ssDNA wird von Wirtsfaktoren, in der Regel der RNA-Polymerase, erkannt, die eine kurze RNA zur Initiierung der Synthese des Folgestrangs bilden. Die Funktionalität des sso ist orientierungsabhängig, was auf eine entscheidende Rolle der ungepaarten ssDNA innerhalb der Sekundärstruktur hinweist. Die Synthese des Folgestrangs erfolgt dann wieder über die DNA-Polymerasen (del Solar et al., 1998; Ruiz-Masó et al., 2015).

Die Plasmide mit Replikationsursprung pSH71 und pWV01 gehören zu den RCR-Plasmiden (Kazi et al., 2022). Größere DNA-Fragmente sind meist nicht derartig stabil auf Plasmiden, die nach RCR-Mechanismus replizieren (Kiewiet et al., 1993). RCR-Plasmide zeigen eine hohe Plasmidinkompatibilität (Cho et al., 2020).

3.3.2 Theta-replizierende Plasmide

Eine weitere Form der Plasmid Replikation erfolgt über den Theta-Mechanismus. Bei der DNA-Replikation über den Theta-Mechanismus werden zunächst die parentalen Stränge aufgeschmolzen, eine Primer RNA (pRNA) synthetisiert und die Initiierung der DNA-Synthese durch kovalente Verlängerung der pRNA begonnen. Die DNA-Synthese verläuft dabei auf dem Leitstrang kontinuierlich und auf dem Folgestrang diskontinuierlich ab. Sie kann an einem oder mehreren Ursprungsorten beginnen und die Replikation kann entweder unidirektional oder bidirektional erfolgen (del Solar et al., 1998). Die Theta-Replikation wird auch als chromosomal ähnlich angesehen, da der Leit- und Folgestrang koordiniert repliziert werden und die Synthese des Folgestrangs diskontinuierlich erfolgt. Für diese Art der Replikation sind keine DNA-Brüche erforderlich. Diese koordinierte Replikation führt zu Zwischenprodukten, die unter dem Elektronenmikroskop ähnlich wie der griechische Buchstabe Theta zu sehen sind und daher ihre Bezeichnung haben. Der erste Schritt, das Öffnen des DNA-Doppelstrangs, ist für die Assemblierung des Replisoms erforderlich, welches in Theta-Plasmiden DnaA-abhängig oder PriA-abhängig sein kann. DnaA ist ein Initiatorprotein der Replikation und PriA initiiert die Assemblierung des Primosoms (Kogoma, 1997; Lilly & Camps, 2015). Die DnaA-abhängige

Assemblierung ähnelt stark der Replikationsinitiierung an *oriC*, der Stelle, an der die chromosomale Replikation beginnt. Im Gegensatz dazu ähnelt die PriA-abhängige Assemblierung dem Replikationsrestart nach einem Replikationsgabelstillstand, der von der D-Loop-Bildung abhängt, wobei der zusätzliche DNA-Strang durch homologe Rekombination bereitgestellt wird (Lilly & Camps, 2015). Der D-Loop (ein Zwischenprodukt der homologen Rekombination), welcher Teil der induzierbaren DNA-Replikation ist, braucht als Notwendigkeit sowohl die Rekombinase-Aktivität des RecA-Proteins als auch die Helikaseaktivität von RecBCD. Da RecBCD für die Aktivität ein Doppelstrang-DNA-Ende benötigt, muss der Prozess durch einen Doppelstrangbruch (DSB) ausgelöst werden. Dies geschieht im D-Loop-Modell durch *oriM*-spezifische Endonukleasen. Künstlich erzeugte Doppelstrangbrüche können eine Ursprungs-unabhängige Plasmidreplikation auslösen, welche nicht das Vorhandensein von *oriM* als Notwendigkeit voraussetzt (Kogoma, 1997).

Die beiden Replikationsursprünge pCI305 und pAM β 1 gehören zu den Klasse 1 Plasmiden, die nach dem Theta-Mechanismus replizieren. Diese Plasmide sind strukturell stabil und replizieren in vielen verschiedenen Milchsäurebakterien. Sie haben eine große Wirtsspanne und sind somit oft *shuttle* Vektoren. Durch ihre Stabilität können sie große DNA-Fragmente tragen und eignen sich somit optimal als Expressionsvektoren. Im Allgemeinen lässt sich festhalten, dass Theta-replizierende Plasmide stabiler sind, da kein ssDNA-Intermediat gebildet wird, und dass mehrere Theta-replizierende Plasmide nebeneinander in einer Zelle vorliegen können (Cho et al., 2020; Kazi et al., 2022). Auf den vier sequenzierten Plasmiden des Stammes *L. cremoris* SK11 konnten sechs Replikationsursprünge gefunden werden, die durch das Gen *repB* kodiert sind. Sie gehören alle zu den Theta-replizierenden Plasmiden (Siezen et al., 2005). Seegers et al. (1994) konnten ebenfalls feststellen, dass Plasmide des Stammes *L. cremoris* Wg2 eine hohe Sequenzidentität im Bereich der Replikationsregion haben und alle Gene tragen, die für das Replikationsprotein RepB kodieren. Die Autoren konnten dieses Merkmal auch bei anderen *Lactococcus* spp. Plasmiden feststellen. Bei van Mastrigt et al. (2018) enthielten elf der zwölf sequenzierten Plasmide des untersuchten Starterkulturstammes das RepB Protein und replizieren somit ebenfalls über den Theta-Mechanismus.

3.4 Genom-Editierung in Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien zählen zu der Gruppe der als allgemein sicher anerkannten (Englisch: *generally recognized as safe*, GRAS) Organismen und werden daher nicht nur in der Lebensmittelindustrie als Starterkulturen eingesetzt, sondern eignen sich als Zell-Fabriken auch zur Herstellung rekombinanter Proteine. Aufgrund dessen werden Milchsäurebakterien, wie *Lactococcus* spp., seit Jahrzehnten in der Gentechnik eingesetzt und damit immer neue Werkzeuge zur Genom-Editierung entwickelt. Plasmide werden häufig zur Expression von

heterologen Genen eingesetzt, da sie in einer hohen Kopienzahl vorliegen und sich selbst replizieren (Cho et al., 2020). Obwohl die Struktur von Prokaryoten einfacher ist, können sich ihre Genome unter Umweltstress ständig verändern, was zu einer komplexen Vielfalt führt. Die Genom-Editierung in Prokaryoten ist aufgrund ihrer geringen Transformationseffizienz und komplexen Vielfalt eine Herausforderung (Song et al., 2020).

3.4.1 Plasmide zur Genom-Editierung

Die in Milchsäurebakterien verwendeten Vektoren beruhen auf den zuvor charakterisierten Plasmiden, welche sich in ihre Replikationsarten unterteilen lassen. Der Replikationsursprung (Englisch: *origin of replication*, ori) spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Kopienzahl, der Stabilität, des Wirtsbereichs, der Inkompatibilität und der Tragfähigkeit und sollte daher sorgfältig ausgewählt werden. Im Allgemeinen wird bei der Kopienzahl der Plasmide zwischen niedriger Kopienzahl (Englisch: *low-copy*) und hoher Kopienzahl (Englisch: *high-copy*) unterschieden. Es gibt vier Klassen an Replikons, die für Milchsäurebakterien genutzt werden und auf folgenden Replikationsursprüngen basieren: pWV01, pSH71, pCI305 und pAM β 1. Eine Einteilung der Plasmide in die Plasmidklassen ist in Tabelle 1 zu sehen (Kazi et al., 2022).

Tabelle 1: Plasmidklassen für die Genom-Editierung in *Lactococcus* spp.-: bedeutet wurde nicht verwendet.

Replikationsursprung	Beispiele zugehöriger Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.	Replikationsart
pWV01	pGK12	Rolling Circle
pSH71	pNZ8048	
pCI305	-	Theta-replizierend
pAM β 1	pTKRH2, pNZ9530	

Ein Beispiel für einen in der Genom-Editierung eingesetzten Theta-replizierenden Vektor ist der pTKRH2: Hierbei handelt es sich um einen *Shuttle*-Vektor. Als *Shuttle*-Vektor zeichnet ihn aus, dass er sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien replizieren kann. Als Replikationsursprünge besitzt er von *Escherichia coli* p15A und von *Enterococcus faecalis* pAM β 1. Aufgrund einer *multiple cloning site* (MCS) im *lacZ*-Gen ist ein Blau-Weiß-Screening möglich (O'Sullivan & Klaenhammer, 1993).

Plasmide des pWV01-Replikons sind eng verwandt mit Plasmiden des pSH71-Replikons, da beide über den RCR-Mechanismus replizieren und die Gene *repA* und *repC* tragen. Beide Replikons sind in der Lage, sich in Gram-positiven und in Gram-negativen Bakterien zu replizieren. Der Vektor pGK12 besitzt den pWV01-Replikationsursprung und wurde als *Shuttle*-Vektor zwischen *Bacillus subtilis*, *E. coli* und *L. lactis* entwickelt. Die Kopienzahl pro

Zelle ist jedoch mit fünf Kopien für *B. subtilis*, 60 Kopien für *E. coli* und drei Kopien für *L. lactis* gering (Kok et al., 1984). Mehrere Klonierungsplasmide mit hoher und niedriger Kopienzahl wurden aus dem pSH71-Replikon entwickelt, wobei das parentale Plasmid des pSH71-Replikon mit 200 Kopien pro Zelle in Milchsäurebakterien vorliegt (Duarte & Monteiro, 2021).

Eines dieser Klonierungsplasmide ist pNZ8048, welches auf dem pSH71 Rückgrat beruht und ein RCR-Plasmid ist. Es handelt sich um einen translationalen Fusionsvektor, da mit der NcoI-Schnittstelle direkt das Startcodon des zu translatierenden Gens beginnt. pNZ8048 trägt einen Nisin-Promotor (*PnisA*) und beruht auf dem Nisin-kontrollierten Expressionssystem (Englisch: *nisin-controlled expression*, NICE) (Kuipers et al., 1998). Das NICE-System ist das wahrscheinlich bekannteste System zur Induzierung von Genen in Milchsäurebakterien. Dies wurde 1995 von Kuipers et al. erstmals beschrieben und die Induktion der heterologen Expression einer β -Glucuronidase durch Nisin dargestellt. Nisin ist ein antimikrobielles Peptid, welches aus 34 Aminosäuren besteht. Es bindet zunächst an Lipid II und bildet damit zusammen kleine Poren in der Zytoplasmamembran, die zum Austritt kleiner Moleküle, darunter Adenosintriphosphat (ATP), und in der Folge zum Zelltod führen. Die Biosynthese von Nisin wird durch ein Cluster bestehend aus elf Genen kodiert, wobei die Gene *nisR* und *nisK* an der Regulation der Expression der restlichen Gene beteiligt sind. NisR und NisK gehören zur Familie der bakteriellen Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme. NisR, welches durch NisK aktiviert wird, induziert die Promotoren *PnisA* und *PnisF*. Der Promotor, der die Expression von *nisR* und *nisK* steuert, ist davon nicht betroffen (Mierau & Kleerebezem, 2005). Durch Verwendung des Stammes *L. cremoris* NZ9000, der die Gene *nisRK* chromosomal trägt, und eines Plasmids, welches den *PnisA*-Promotor kodiert hat, lässt sich das gewünschte Gen hinter dem *PnisA*-Promotor überexprimieren (Kuipers et al., 1998).

Ein weiteres Plasmid, welches zur Genom-Editierung bei *Lactococcus* spp. eingesetzt wird und zum NICE-System zählt, ist der Vektor pNZ9530. Hierbei sind die *nisRK* Gene auf das Plasmid kloniert, die durch eine dem Replikationsursprung nachgeschaltete Transkription (Englisch: *rep read trough*) transkribiert werden und somit unter der Kontrolle des Promotors des Replikationsproteins stehen. Dieses Plasmid kann als duales Plasmid-System mit einem Plasmid, das einen Nisin-Promotor trägt, zur heterologen Transkription von Genen eingesetzt werden (Kleerebezem et al., 1997). Da pNZ9530, das Rückgrat von pIL252, einem *low-copy* Vektor, trägt, beruht es ebenfalls auf dem pAM β 1-Replikationsursprung (Kleerebezem et al., 1997; Simon & Chopin, 1988). Eine Weiterentwicklung zur Anwendung des NICE-Systems ist der pMSP3535VA. Dieser Vektor trägt einen pVA380-1 Replikationsursprung, die *nisRK*-Gene im Rückgrat und den *PnisA*-Promotor vor einer MCS. Somit lässt er sich in Wirten anwenden, die die *nisRK*-Gene nicht chromosomal kodiert haben, da die Expression dieser Gene unabhängig vom *PnisA*-Promotor ist (Bryan et al., 2000). Die Effizienz eines

Expressionssysteme werden häufig durch die Funktionsweise des verwendeten Promotors bestimmt. Hierbei werden konstitutive Promotoren, die keine externe Induktion erfordern, meist für *in vivo* Ansätze und induzierbare Promotoren für die Überexpression rekombinanter Proteine verwendet (Kazi et al., 2022). Aus *L. lactis* N8 wurden mehrere robuste, synthetische konstitutive Promotoren (BP8, P5, P3, P2) identifiziert (Cho et al., 2020). Ein weiteres System, neben dem NICE-System, bei dem ein induzierbarer Promotor verwendet wurde, beruht auf der Verwendung eines Xylose Promotors. Das System wurde zur Expression heterologer Proteine, welche ans extrazelluläre Medium abgegeben werden, konzipiert. Die Induzierung beruht auf dem Xylose-gesteuerten Promotor Pxy/T. Dieser Promotor lässt sich an- und ausschalten, indem in das Wachstumsmedium Glucose oder Xylose gegeben wird und somit eine induzierbare Expression möglich ist (Miyoshi et al., 2004).

3.4.2 Genom-Editierung mittels Rekombinationstechnik

In den letzten Jahrzehnten hat die Verwendung von Phagen-kodierten Rekombinasen zu vielfältigen Applikationen der Rekombinationstechnik in Milchsäurebakterien geführt (van Pijkeren & Britton, 2014). Die Genom-Editierung mittels homologer Rekombination wurde in *E. coli* entwickelt. Sie basiert auf der Expression dreier Lambda (λ) Phagen-abgeleiteter Proteine Beta, Gam und Exo, die unter dem Sammelbegriff λ -Red-System abgekürzt werden. Beta ist dabei ein ssDNA-Bindeprotein, Gam unterdrückt die Wirtsnuklease und Exo ist eine 5'-3' Exonuklease (Murphy, 1998; Yu et al., 2000a). Bei der Verwendung von ssDNA konnte gezeigt werden, dass Beta allein Rekombinanten mit nur 30 bp kurzer ssDNA als Vorlage in chromosomaler DNA generieren kann (Ellis et al., 2001). Zur Genom-Editierung kann dsDNA mit kurzen flankierenden Bereichen durch Zellen, die das λ -Red-System exprimieren, in die Zielsequenz eingebaut werden (Yu et al., 2000a).

3.4.2.1 ssDNA und dsDNA Rekombination

Die ssDNA-Rekombination (Rekombinationstechnik mittels Verwendung von ssDNA) erzeugt subtile Mutanten im Genom, ohne dass eine Selektion erforderlich ist (van Pijkeren & Britton, 2014). Die Methodik der ssDNA-Rekombination beruht auf der Expression eines Homologs des vom Lambda-Phagen abgeleiteten ssDNA-bindenden Proteins (Beta) oder eines vom λ -Prophagen (RecT) abgeleiteten Homologs. Diese Proteine werden zusammenfassend als Rekombinasen bezeichnet (van Pijkeren et al., 2012). Die einzigen Voraussetzungen zur Genom-Editierung sind die Expression einer Rekombinase und die Fähigkeit ein Oligonukleotid, das die gewünschte Mutation als Basenänderung des Chromosoms enthält, in die Zelle zu transformieren. Rekombinante Zellen lassen sich leicht mit Techniken wie der Polymerase-Kettenreaktion (Englisch: *polymerase chain reaction*, PCR) in Verbindung mit Restriktionsverdau, wenn die Mutation eine Restriktionsstelle verändert, oder PCR-Amplifikation und Sequenzierung nach Kolonie-PCR, identifizieren. Eine besonders

zeiteffiziente Methode mit geringem Screeningaufwand ist hierbei das *mismatch amplifikation mutation assay* (MAMA) kombiniert mit einer PCR (van Pijkeren & Britton, 2014). Die MAMA-PCR bietet die Möglichkeit des Nachweises einer Mutation über eine einzige PCR. Zwei Primer (Wildtyp-Primer) amplifizieren dabei beispielsweise ein 1000 bp DNA-Fragment, wobei ein dritter Primer (Mutagenese-Primer) von der Polymerase nur verlängert wird, wenn die Mutation in das Chromosom eingebaut wurde und so ein zweites Amplikon mit beispielsweise einer Größe von 500 bp entsteht (van Pijkeren & Britton, 2012). Über Gelelektrophorese lässt sich erkennen, welche Kolonien die Mutation tragen, da die Primer zwei Amplikons in der PCR generieren und somit zwei Banden auf dem Bild der Gelelektrophorese zu erkennen sind.

Der Einbau der Mutation mittels Rekombinase, beispielsweise RecT, erfolgt wie in Abbildung 3 dargestellt. RecT ist ebenso wie Beta ein ssDNA bindendes Protein. Während der Rekombination binden Beta oder RecT an die ssDNA und schützen diese, während sie die DNA an der komplementären ssDNA in der Zelle anlagern. Außerdem besitzen beide Proteine eine Strang-Invasions-Aktivität und verdrängen somit den eigentlich komplementären Strang der ssDNA der Zelle (Thomason et al., 2014).

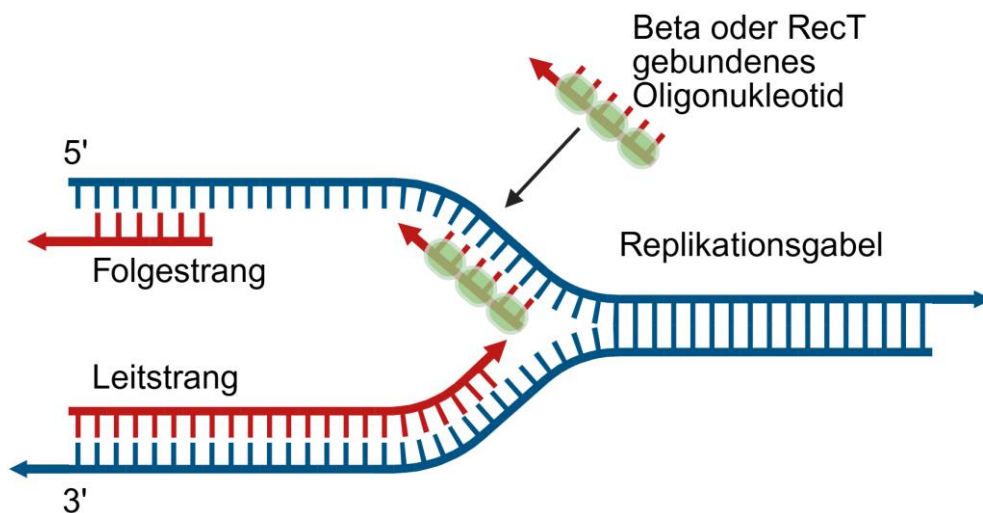


Abbildung 3: Schematische Darstellung der DNA-Replikationsgabel nach Thomason et al. (2014). Das DNA Oligonukleotid wird vom einem ssDNA bindenden Protein (Beta oder RecT) eingehüllt und lagert sich an die Vorlage des Folgestrangs in einer Lücke bei der diskontinuierlichen Replikation an. Erstellt mit BioRender.com.

Es wird davon ausgegangen, dass bei der Verwendung von ssDNA zur gezielten Gen-Reparatur keine klassische homologe Rekombination über den Homologe-Rekombinations (Englisch: *Homology directed repair*, HDR)-Mechanismus abläuft, sondern eine Anlagerungs-Integration erfolgt. Dabei lagert sich die ssDNA zunächst an der einzelsträngigen Region der Replikationsgabel an, bevor die DNA-Polymerase und die Ligase den Genreparationsmechanismus fortsetzen (Huen et al., 2006). Das Oligonukleotid dient somit entweder als Primer für die Okazaki-Fragment-Synthese oder wird in die DNA ligiert, weil es als Okazaki-Fragment erkannt wird (van Pijkeren & Britton, 2014).

Die Übertragung der ssDNA-Rekombination von *E. coli* auf Gram-positive Bakterien war zunächst schwierig, obwohl Homologe des *recT* in Gram-positiven Bakterien gefunden wurden. Daher war es wichtig eine passende Rekombinase zu finden, um die ssDNA-Rekombination in Milchsäurebakterien durchführen zu können (van Pijkeren & Britton, 2014). Beim Screening mehrerer *Lactococcus* spp. Stämme nach nativen Rekombinasen konnte zwar eine hohe Sequenzidentität zu der in *Limosilactobacillus reuteri* (früher: *Lactobacillus reuteri*; Zheng et al. 2020) aktiven Rekombinase gefunden werden, jedoch war die relative Aktivität der Enzyme geringer (van Pijkeren et al., 2012). Bemerkenswerterweise lieferte ein aus *E. faecalis* isoliertes RecT-Protein in *E. coli* einen ähnlichen Anteil an rekombinanten Zellen wie das aus dem Phagen Lambda stammende Beta-Protein. Die Beobachtung, dass RecT aus *E. faecalis* in phylogenetisch entfernten Bakterien effizient ist, lässt darauf schließen, dass es sich um eine hocheffiziente Rekombinase handelt. Außerdem ist die Rekombinationseffizienz nicht automatisch höher, wenn eine endogene Rekombinase verwendet wird. So konnten in *Lactiplantibacillus plantarum* (früher: *Lactobacillus plantarum*; Zheng et al. 2020) mehr rekombinante Klone nachgewiesen werden, wenn eine Rekombinase aus *Ll. reuteri* statt eine Rekombinase aus *Lp. plantarum* verwendet wurde (van Pijkeren & Britton, 2014; van Pijkeren et al., 2012).

Zur erfolgreichen Verwendung der ssDNA oder dsDNA Rekombinationstechniken sollten folgende Punkte beachtet werden: Das Rekombinations-Oligonukleotid, sprich das Reparatur-Template, sollte bei einer Punktmutation oder dem Austausch von wenigen Basen meist um die 70 - 100 Basen lang sein und homologe Bereiche zu der Zielsequenz vorweisen, sodass die Veränderung zentral im Oligonukleotid liegt. Bei einem Einzelbasenaustausch sollten jedoch nicht mehr als fünf Basen anders als zu der Zielsequenz sein. Eine hohe Effizienz der ssDNA-Rekombination wird erreicht, wenn das Oligonukleotid dem Folgestrang der DNA-Replikation entspricht, der für die ssDNA-Rekombination 15-20-mal effizienter als der komplementäre Strang ist (Thomason et al., 2014).

Ebenso ist zu beachten, dass die Wirtszellen Fehlbasenpaarungs-Reparaturmechanismen (Englisch: *mismatch repair*, MMR) tragen. Da das rekombinante Oligonukleotid sich wie eine Vorlage für den Folgestrang an die Replikationsgabel anlagert, wird es als Teil des neu synthetisierten Strangs betrachtet. Daher repariert der MMR-Mechanismus der Zelle das Oligonukleotid zurück zum Wildtyp. Dies kann die Rekombinationseffizienz um das 100-fache reduzieren (Costantino & Court, 2003). Bestätigt wurde dies, indem Mutanten verwendet wurden, die einen Defekt im MMR-Mechanismus enthielten und dies zu einer Erhöhung der ssDNA-Rekombinationseffizienz führte (Li et al., 2003). Bei Verwendung von MMR-Mutanten treten jedoch viele unerwünschte Mutationen an anderen Stellen im Genom auf. Um dieses Problem zu umgehen, können ssDNA-Oligonukleotide zur Fehlbasenpaarung so gestaltet

werden, dass sie die in MMR-Mutanten beobachtete Effizienzsteigerung imitieren und nicht zu einer Auslösung des MMR-Mechanismus führen. Um den MMR-Mechanismus in *L. lactis* zu umgehen, ist es ausreichend, vier bis fünf benachbarte Basenfehlpaarungen auf dem ssDNA Reparatur-Template zu verwenden (van Pijkeren & Britton, 2014).

Im Allgemeinen erfordert das Einfügen oder Entfernen von DNA-Segmenten, die länger als 20 Basen sind, ein Selektionsverfahren, da die Effizienz solcher Reaktionen nicht hoch genug ist, um nach Rekombinationen zu screenen. Die dsDNA-Rekombinationstechnik eignet sich, um größere chromosomale Regionen zu deletieren, da die Effizienz bei Verwendung von ssDNA-Oligonukleotiden hierfür bei 0,01 % - 0,1 % liegt. Diese Technik wurde zunächst für *E. coli* entwickelt, um Gen-Knockouts im Chromosom oder auf künstlichen Bakterienchromosomen routinemäßig durchzuführen (Thomason et al., 2014). Die dsDNA-Rekombinationstechnik, um Plasmide in einer Zelle zu mutieren, wurde wie folgt durchgeführt: Es wurde eine Antibiotika-Resistenzgen-Kassette über PCR von einem Plasmid amplifiziert und in ein anderes Plasmid *in vivo* kloniert. Zunächst wurde das Lambda-System der *E. coli* Zellen induziert, sodass diese Beta, Gam und Exo exprimierten. Anschließend wurde über Elektroporation die amplifizierte Gen-Kassette in die Zellen eingebracht. Dadurch wurde *in vivo* auf dem pGB2 die Spectinomycin-Gen-Kassette gegen die zuvor durch PCR amplifizierte Chloramphenicol-Gen-Kassette ausgetauscht, sodass die Zellen, die das rekombinanten Plasmid tragen, Chloramphenicol resistent sind. Der verwendete Vektor pGB2 stammt von pSC1010 ab (Yu et al., 2000b). pSC101 gehört zu den Theta-replizierenden Plasmiden (del Solar et al., 1998; Lilly & Camps, 2015). Die Autoren Yu et al. (2000b) versuchten ebenfalls pRB322-Mutationen durchzuführen, um zu untersuchen, ob diese Rekombinationstechnik sich gleichermaßen auf Theta-replizierende Plasmide und RCR-Plasmide anwenden lässt. Sie erhielten Rekombinanten, die als Dimere und höhere Multimere mit nicht rekombinanten Plasmiden im Tandem verbunden waren. In Abwesenheit von RecBCD replizieren sich pRB322-Derivate durch einen *Rolling-Circle* Mechanismus und das Plasmid wandelt sich vom Monomer zu Multimeren um. Dies ist spezifisch für Replikons, die nach RCR-Mechanismus replizieren, da die Autoren zeigen konnten, dass der Typ pGB2 keine Multimere bildet (Yu et al., 2000b).

3.4.3 CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 ist ein System, welches zur Gen-Editierung in kultivierten Zellen, Tieren, Pflanzen und Bakterien genutzt wird (Song et al., 2020). Das System beruht auf gruppierten, regelmäßig angeordneten, kurzen palindromischen DNA-Abschnitten (Englisch: *clustered regularly interspaced palindromic repeats*, CRISPR), dem CRISPR-assoziierten Protein Cas9, welches eine Endonuklease ist, und einer Leitsequenz, bestehend aus einer tracrRNA und einer crRNA. Der Komplex aus tracrRNA und crRNA formt Basenpaare mit der DNA Zielsequenz, die Cas9 ermöglicht einen sequenzspezifischen DSB in der DNA zu erzeugen.

Der Komplex tracrRNA:crRNA wurde als Einzel-Guide RNA (Englisch: *single guide* RNA, sgRNA) bezeichnet, um die Ziel-DNA über Basenpaarung zu lokalisieren und das Cas9 zu binden. Die sgRNA hat zwei entscheidende Merkmale: die 20-Nukleotid-Sequenz am 5'-Ende der sgRNA (auch *Spacer* genannt), die durch Watson-Crick-Basenpaarung die DNA-Zielstelle bestimmt und die doppelsträngige Struktur am 3'-Ende der Leitsequenz, die an Cas9 bindet. Die sgRNA kann dazu verwendet werden, CRISPR-Cas9 so zu programmieren, dass es jede beliebige DNA-Sequenz ansteuert, solange diese an ein Protospacer-angrenzendes Motiv (Englisch: *protospacer adjacent motif*, PAM) angrenzt (Doudna & Charpentier, 2014). Die PAM-Sequenz ist ein kurzes Sequenzmotiv vor der Zielsequenz (*Protospacer*) auf der Ziel-DNA. Die in der Genetik verwendete Endonuklease Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* bindet dabei spezifisch an die PAM-Sequenz 5'-NGG-3' (Sternberg et al., 2014). Cas9 schneidet für gewöhnlich drei Basenpaare stromaufwärts der PAM Sequenz (Jinek et al., 2012). Schematisch ist dies in Abbildung 4 dargestellt.

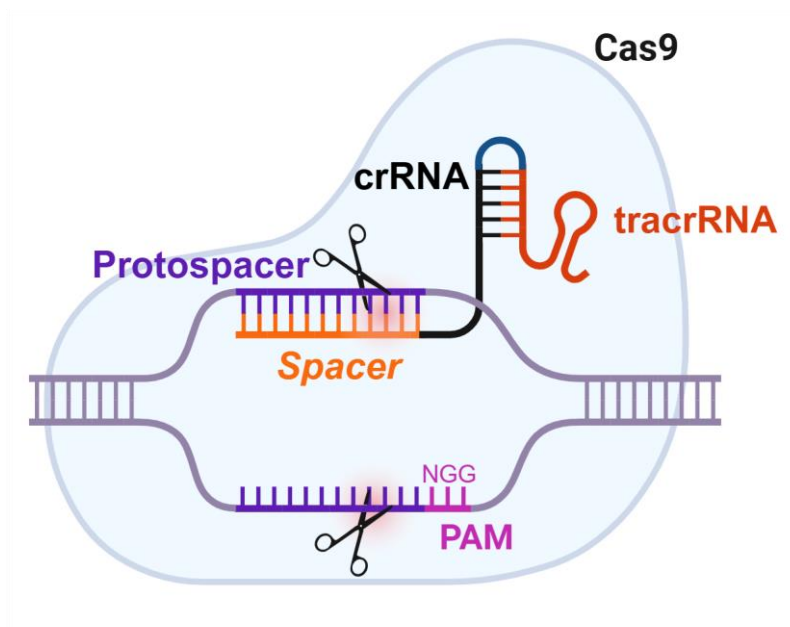


Abbildung 4: Schematische Darstellung von CRISPR-Cas9. Der Komplex aus tracrRNA, crRNA und Spacer wird *single guide* RNA genannt. Frei nach Doudna & Charpentier (2014). Erstellt mit BioRender.com.

Bei der Verwendung von herkömmlichen Mutageneseverfahren in Prokaryonten musste entweder ein Selektionsmarker in den editierten Locus eingebaut werden oder ein zweistufiger Prozess zur Gegenselektion angewendet werden. Durch Transformation eines Ziel-Konstrukts, beispielsweise eines Reparatur-Templates, das eine Mutation in der PAM Sequenz erzeugt, kann das CRISPR-Cas9 System zur Gegenselektion genutzt werden (Jiang et al., 2013). So können die gezielten Reparaturmechanismen des Wirtes verhindert werden. Cas9 fungiert als RNA-gesteuertes DNA-Binde-Protein, wenn es so konstruiert ist, dass es inaktive Mutationen in seinen beiden aktiven Stellen enthält. Ein katalytisch inaktives Cas9 (englisch: *death* Cas9, dCas9) kann zu einer transkriptionellen Herunterregulierung oder

Aktivierung führen, insbesondere, wenn es an eine Aktivator- oder Repressordomäne gekoppelt ist (Doudna & Charpentier, 2014).

Viele Studien haben sich mit der Anwendung des CRISPR-Cas9 Systems in Milchsäurebakterien beschäftigt. So wurden bereits Insertionen, Deletionen und Punktmutationen durch CRISPR-Cas9 Gen-Editierung in Milchsäurebakterien erzeugt (Song et al., 2020). Die Selektion mittels CRISPR–Cas9 ist für die Genom-Editierung bei Bakterien mit geringer Rekombinationseffizienz vielversprechend. Außerdem entfällt dadurch die Notwendigkeit zeitaufwendiger Optimierungsverfahren für die ssDNA-Rekombination (Kok et al., 2017). Oh & van Pijkeren (2014) nutzten CRISPR-Cas9, um es mit Rekombinase-vermittelter ssDNA-Rekombination in *LI. reuteri* zu kombinieren. Sie entwarfen ein Zwei-Plasmid System, bei dem die Rekombinase auf einem pSH71-Replikon Plasmid und die CRISPR-Cas9 Kasette auf einem pAM β 1-Replikon Plasmid kodiert ist. Für *Lactocaseibacillus casei* (früher: *Lactobacillus casei*; Zheng et al. 2020), *Lp. plantarum* und *Levilactobacillus brevis* (früher: *Lactobacillus brevis*; Zheng et al. 2020) wurden ebenfalls CRISPR-Cas9 Studien durchgeführt (Song et al., 2020). Huang et al. (2019) konnten mit ihrem CRISPR-Cas9 System in *Lp. plantarum* zeigen, dass aufgrund des unzureichenden HDR des Wirtes nach dem Screenen von Dutzenden Transformanten keine Mutanten erhalten wurden, und schlussfolgerten, dass ein exogenes Reparatursystem, wie RecT, notwendig ist, um induzierte DSB zu reparieren.

Da Stämme der Spezies *Lactococcus* sensitiv gegenüber Doppelstrangbrüchen sind, die CRISPR-Cas9 assoziiert sind, führen diese zu einer hohen Letalität der Zellen (van der Els et al., 2018). Durch Kombination des CRISPR-Cas9 Systems mit einer Rekombinase kann die Letalität der Zellen nach DSB zur Gegenselektion genutzt werden, wie im Beispiel von Guo et al. (2019): Die Autoren entwarfen ein System, bei dem die RecT-assoziierte Rekombination mit einer ssDNA Vorlage zu Punktmutationen und kleineren Insertionen und Deletionen in *Lactococcus* spp. genutzt werden kann. Im Gegensatz dazu entwarfen Berlec et al. (2018) ein singuläres Plasmid-System ohne Gegenselektion, welches zwei Promotoren enthält, bei dem hinter einem Promotor die Sequenz für die sgRNA kloniert ist, die davon abgelesen wird. Dieses System enthält jedoch keine Rekombinase, mit der Punktmutationen eingebaut werden können. Des Weiteren implementierten Berlec et al. (2018) das Plasmid pNZCRISPRi, welches eine dCas9 Kasette enthält, um ein Gen stillzulegen. Song et al. (2021) entwarfen ein Einzel-Plasmid-System, das CRISPR-Cas9 basiert ist, um größere Deletionen auf dem Genom von *L. cremoris* NZ9000 vorzunehmen. Ein weiteres Einzel-Plasmid System für *L. cremoris* NZ9000 wurde von Zhou et al. (2023) etabliert: Hierbei wurde das λ -Red-System von *E. coli* vor den starken konstitutiven *Lacococcus* spp. Promotor P32 kloniert sowie die CRISPR-Cas9 Kasette vor einen konstitutiven Promotor und ein dsDNA Reparatur-Template

vor einen Nisin-Promotor. Mit diesem System konnten Gen-Insertionen im Chromosom von *L. cremoris* NZ9000 erfolgreich kloniert werden.

3.4.4 Transformation rekombinanter Plasmide in *Lactococcus* spp.

Um Genom-Editierungen in Zellen vorzunehmen, müssen die rekombinanten Vektoren in die Zellen transformiert werden. Die geringe Effizienz, um exogene DNA in Zellen einzubringen, schränkt die Genom-Editierung bei Milchsäurebakterien erheblich ein. Einer der Gründe, wieso Milchsäurebakterien eine geringe Transformationseffizienz aufweisen, ist, dass sie als Gram-positive Organismen eine dicke und starre Peptidoglycan-Schicht enthalten, im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien (Wang et al., 2020).

Ein Verfahren zur Transformation von rekombinanten Plasmiden ist die Elektroporation. Durch die elektrische Entladung bei der Elektroporation entstehen temporär Poren in der Zellwand und Zellmembran. Dieser Vorgang verändert die Elektropermeabilisierung der Zelle, sodass exogene DNA kurzzeitig durch diese Poren in die Zellen eindringen kann (Wang et al., 2020). Ein Protokoll dazu wurde bereits in den 1980er Jahren von Holo & Nes (1989) für *Lactococcus* spp. vorgestellt. Die Autoren konnten eine effektive Methode durch den Zusatz von Glycin und 0,5 M Saccharose entwickeln. Dabei dient Glycin als Inhibitor der Zellwandformation und die Saccharose als osmotischer Stabilisator für die Zellen (Holo & Nes, 1989).

Eine weitere Möglichkeit der Transformation von Plasmiden ist die Konjugation. Hierbei erfolgt der horizontale Gentransfer über Spezies hinaus (Willetts & Wilkins, 1984). Mit pAT187 wurde bereits vor vielen Jahren ein Plasmid zur Konjugation zwischen *E. coli* und *L. lactis* verwendet. Der Vektor pAT187, der einen pAM β 1-Replikationsursprung trägt, konnte zwischen *E. coli* und *L. lactis* über Konjugation transformiert werden (Trieu-Cuot et al., 1991). Die Konjugation von *E. coli* WM3064, welcher DAP negativ ist, zu Bifidobakterien wurde von Dominguez et al. (2013) beschrieben. Dabei wurde ein Vektor konjugiert, der einen *oriT* trägt und von dem RP4 Konjugationssystem des *E. coli* Stammes WM3064 mobilisiert werden kann. *Lactococcus* spp. Stämme untereinander können aufgrund ihrer genetischen Voraussetzungen horizontalen Gentransfer über Konjugation betreiben (Gasson et al., 1995).

3.4.5 Schwierigkeiten der Plasmid-vermittelten Genom-Editierung in *Lactococcus* spp.

Zu den Schwierigkeiten bei der Genom-Editierung in *Lactococcus* spp. wird bereits seit mehreren Jahren geforscht, sodass folgende Besonderheiten hier erwähnt werden:

- **Plasmidinkompatibilität:** Bakterielle Plasmide weisen Inkompatibilitäten auf. Plasmide mit ähnlichen Replikationsmechanismen können wahrscheinlich nicht im selben Wirt nebeneinander vorkommen. So ist beispielsweise das Plasmid pCI305 inkompatibel zu anderen Theta-replizierenden Plasmiden, jedoch nicht zu RCR-

Plasmiden wie pSH71 und pWV01 (Foley et al., 1993). Émond et al. (2001) konnten ebenfalls zeigen, dass einige Theta-replizierende Plasmide inkompatibel zueinander sind. Mehrere Plasmide, die vom RCR-Plasmid pWV01 abstammen, können jedoch nebeneinander in einer Zelle vorkommen (Seegers et al., 1994). Des Weiteren werden endogene Plasmide, die native selektierbare Marker tragen, in der Regel effektiver repliziert und exprimiert als heterologe Plasmide (Wang et al., 2020).

- **Plasmidinstabilität:** Plasmide können während der Zellteilung verloren gehen oder DNA-Segmente können neu angeordnet werden, was zum Verlust des Plasmid Rückgrats führen kann (Kazi et al., 2022). Die Plasmidstabilität, insbesondere bei großen *Inserts*, kann abhängig vom Replikon sein (Kiewiet et al., 1993).
- **Konzentration der ssDNA:** Bei Verwendung eines ssDNA Rekombinationssystems in *Lactococcus* spp. ist die Konzentration des Oligonukleotids zu beachten: 200 µg und 1mg können zur Lyse der Zelle führen, sodass eine Konzentration bis 100 µg empfohlen wird (van Pijkeren & Britton, 2014).
- **Reparaturmechanismus des Wirtes:** Da die Spaltung der dsDNA für Bakterien meist tödlich ist, löst dies vermutlich die Reparaturmechanismen HDR oder die nicht-homologe Endverknüpfung (Englisch: *non-homologous end joining*, NHEJ) der Zelle aus. Der genaue Reparaturmechanismus ist noch unklar und kann variieren (Vento et al., 2019). Die homolog-vermittelte Rekombination mittels RecA gehört zur SOS-Antwort von Bakterien und wird bei DSB angewendet. RecA katalysiert die homologe Rekombination und den Strang-Austausch zwischen ssDNA und dsDNA im HDR Prozess und spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur (Kogoma, 1997). Da das DSB-Reparatursystem in *Lactococcus* spp. stark von anderen Bakterien abweicht, kann es zu einer limitierten Rekombinationseffizienz führen (Quiberoni et al., 2001). Des Weiteren ist die Rekombinationsrate von *L. lactis* ohne Selektionsdruck sehr gering, was zu der Annahme führt, dass der HDR Mechanismus bei *Lactococcus* spp. gering ausgeprägt ist (van Pijkeren & Britton, 2012).
- **Tragfähigkeit des Vektors:** Die Tragfähigkeit des Vektors ist definiert als die Größe eines *Inserts*, das in ein Genexpressionssystem kloniert werden kann, ohne die Stabilität oder Funktion des Plasmids zu beeinträchtigen. Die Größe des Vektors spielt bei der Bestimmung seiner Tragfähigkeit eine entscheidende Rolle (Kazi et al., 2022).
- **Zielgene:** Die Effizienz der Gen-Editierung ist stark variabel bezüglich des Zielgens und der verwendeten Stämme (Leenay et al., 2019).

4 Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit der Transformation und Nutzung des RecT/CRISPR-Cas9 Systems in *Lactococcus* spp., um Mutationen in Genen, die für Proteine des proteolytischen Systems kodieren, zu erzeugen. Im ersten Teil der Arbeit sollte das Zwei-Plasmid System zur Anwendung in *Lactococcus* Stämmen konstruiert und entwickelt werden und im zweiten Teil der Arbeit sollte es in *Lactococcus* Stämme transformiert werden. In einem dritten Teil sollte die Effizienz des CRISPR-Cas9 Systems in *L. cremoris* NZ9000 untersucht werden.

Zunächst sollte die molekularbiologische Entwicklung der beiden Vektoren zur Gegenselektion mittels CRISPR-Cas9 beschrieben werden. In den Studien von Guo et al. (2019) wurde bereits ein ähnliches System entworfen, sodass der CRISPR-Cas9 Vektor wie von den Autoren beschrieben hergestellt werden konnte. Die Problematik hierbei war, dass für das Rekombinase-Plasmid von Guo et al. (2019) das Rückgrat pSEC:Leiss:NUC verwendet wurde und dieser Vektor aufgrund fehlender Verfügbarkeit in dieser Arbeit nicht verwendet werden konnte. Deshalb sollte ein funktionell gleicher Vektor mit einem anderen Rückgrat hergestellt werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Rückgrat des Plasmids pNZ8048 verwendet und die entsprechenden Abschnitte wurden auf dieses Plasmid kloniert. Hierbei war zu beachten, dass der Promotor und die Gensequenz zueinander passend sein mussten. Das System nach Guo et al. (2019) wurde verwendet, da Punktmutationen an den Aminosäuren der katalytischen Triade des *prtP*-Gens eingebaut werden sollten und dieses System dazu den Vorteil der Gegenselektion bot.

Anschließend sollte das System in die Starterkulturen transformiert werden, da bislang keine Transformation in isolierte Starterkulturstämmen bekannt war. Die Hauptuntersuchung im zweiten Teil der Arbeit befasste sich mit der Frage, wie sich rekombinante Plasmide in Starterkulturstämmen transformieren lassen. Dabei wurden verschiedene Transformationsbedingungen und Transformationsarten untersucht. Bei den Transformationsarten sollten die Elektroporation und die Konjugation in die Starterkulturstämmen erforscht werden. Bei den Transformationsbedingungen galt es, verschiedene Wachstumsbedingungen und Plasmidkonzentrationen zu analysieren. Zu den Wachstumsbedingungen zählte die Verwendung von Medium mit Glycin-Zusatz und die Wachstumsphase der Starterkulturstämmen. So sollte überprüft werden, ob sich Zellen in der exponentiellen oder stationären Phase eher zur Transformation eignen. Schließlich sollte auch ein weiteres Plasmid mit Xylose Promotor entwickelt werden, um eine ssDNA Rekombination ohne Gegenselektion in den Starterkulturstämmen zu untersuchen, und diese Mutationen mittels MAMA-PCR überprüft werden. Mit SDS-PAGE sollte abschließend noch die Überexpression des Proteins RecT, dessen Gen zur Mutation mit dem Reparatur-Template in die Zellen transformiert wurde, durch den Xylose- und den Nisin-Promotor untersucht werden.

Anschließend sollte das entwickelte CRISPR-Cas9 System in den Labor-Stamm *L. cremoris* NZ9000 transformiert werden und es sollten unterschiedliche Methoden zur Nisin-Induzierung verglichen werden. Es wurde das *codY*-Gen und die CodY Bindestelle vor dem *oppD*-Gen untersucht, da es sich bei CodY um einen Transkriptionsregulator handelt, der auf das Gen *oppD*, welches Teil des proteolytischen System ist, wirkt. Final sollte analysiert werden, ob die Mutanten, die so erzeugt wurden, bereits anderes Wachstumsverhalten als der Wildtyp-Stamm besitzen.

Zusammenfassend sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob und wie sich Starterkulturstämme mutieren lassen und ob dies mit dem beschriebenen Plasmid-System möglich ist. Um die Problemstellung dieser Untersuchung zu bearbeiten, wurden die in Abbildung 5 dargestellten Methoden gewählt.

Plasmidkonstruktion

RecT-Plasmid/*PnisA* RecT-Plasmid/*Pxy/T* Cas9-Plasmid Derivate

Transformation

Screening der Transformanten/ potenziellen Mutanten

Erzeugung der Mutanten

Lactococcus spp. + Nisin + Xylose

Lactococcus spp. die RecT exprimieren *Lactococcus* spp. die RecT exprimieren

pCas9 Reparatur-Template

PCR

SDS-PAGE zur RecT Expression

Kultivierung in Milchträt-Bouillon

27

5 Materialien

5.1 Stammlösungen, Puffer, Chemikalien, Reagenzien, Kits und Geräte

In Tabelle 2 sind die Antibiotika-Stammlösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgeführt. Für die Antibiotika-Stammlösungen wurde die jeweilige Lösung steril filtriert. Ebenfalls wurde der TBF1- und der TBF2-Puffer steril filtriert. Hierfür wurde ein PES-Filter mit 0,22 µm Porengröße (Artikelnummer: P668.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. In Tabelle 3 sind die verwendeten Puffer sowie Stammlösungen und deren Zusammensetzung dargestellt. Diese wurden mit vollentsalztem (VE)-Wasser oder Reinstwasser hergestellt. Die verwendeten Chemikalien (s. Tabelle 75), Reagenzien (s. Tabelle 76) und Kits (s. Tabelle 77) sind im Anhang zu sehen. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme stammen, wenn nicht anders erwähnt, von NEB (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland). Die verwendeten Geräte in dieser Arbeit sind in Tabelle 78 im Anhang gelistet.

Tabelle 2: Antibiotika mit Konzentrationen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle Antibiotikallösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Antibiotikum	Konzentration
Chloramphenicol (Cat)	25 mg/mL in 70 % Ethanol
Erythromycin (Er)	15 mg/mL in 70 % Ethanol
Kanamycin (Kan)	100 mg/mL in VE-Wasser

Tabelle 3: Zusammensetzung der Puffer und Stammlösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. T = Lagertemperatur.

Puffer/ Stammlösung	Zusammensetzung	T [°C]
Kaliumchlorid-Lösung	0,25 M KCl in VE-Wasser gelöst	4
Glucose-Lösung	1 M Glucose-Monohydrat in VE-Wasser gelöst	4
IPTG-Lösung	100 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) in Reinstwasser gelöst	-20
PEG-Lösung	100 mM 13 % PEG8000 in 1,6 M NaCl-Lösung	4
1x SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS in VE-Wasser	20
Magnesiumchlorid-Lösung	2 M MgCl ₂ in VE-Wasser gelöst	4
X-β Gal-Lösung	20 mg/mL X-β-Gal (X-Gal) in Dimethylsulfoxid gelöst	-20
Natrium-Acetat-Lösung	3 M NaCH ₃ COO in VE-Wasser gelöst	4
Calciumchlorid-Lösung	5 M CaCl ₂ in VE-Wasser gelöst	
5 x SDS-Ladepuffer	250 mM TRIS, 8 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 40 % Glycerin, 100 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) in ddH ₂ O, pH 6,8	-20
APS-Lösung	10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) in Reinstwasser	4
DAP	60 mM Diaminopimelinsäure (DAP) in Reinstwasser gelöst	-20
EB-Puffer	Verwendet von QIAGEN, 10mM Tris-Cl, pH 8,5	20
Entfärbelösung für SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)	40 % Ethanol, 10 % Essigsäure in VE-Wasser	20
Enzymatischer Lysepuffer	20 mM TRIS, 2 mM EDTA-Dinatriumsalz, 1,2 % Triton X-100 in Reinstwasser, pH 8,0	4
Färbelösung für SDS-PAGE	0,8 % Brilliant Blau R-250, 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure in VE-Wasser	20
Lysozym	100 mg/mL Lysozym in Reinstwasser gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert	-20
Nisin	10 mg/mL 2,5 %iges Nisin in VE-Wasser gelöst, aliquotiert	-20
NPI-10	50 mM NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol in VE-Wasser, pH 8,0	4
PBS	Nach Herstellerangaben in VE-Wasser gelöst	4

5 Materialien

Tabelle 3 (Fortsetzung): Zusammensetzung der Puffer und Stammlösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.
T = Lagertemperatur.

Puffer/ Stammlösung	Zusammensetzung	T [°C]
Sammelgel-Puffer	0,5 M TRIS, 0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS) in Reinstwasser, pH 6,8	20
TBF1	100 mM RbCl, 50mM, $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 30 mM CH_3COOK , 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, 15 % Glycerin in VE-Wasser pH 5,8	4
TBF2	10 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), 10 mM RbCl, 75mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 15 % Glycerin in VE-Wasser, pH 6,8	4
Trenngel-Puffer	1,5 M TRIS, 0,4 % SDS in Reinstwasser, pH 8,8	20
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Dinatriumsalz (pH 8,0) in Reinstwasser, mit Eisessig auf pH 8,5 eingestellt	20

5.2 Nährmedien und Zusätze

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Medien und Agar wurden mit VE-Wasser hergestellt. Alle hergestellten Medien und Agar, sowie Reinstwasser zum Waschen der Zellen, wurden für 15 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Die Antibiotikallösungen wurden nach Abkühlen des Agars auf etwa 55 °C hinzugegeben. Mit Medium sind immer die Boullion und Agar des jeweiligen Mediums gemeint. Die Agarplatten mit Antibiotikazusatz wurden nicht länger als sechs Wochen verwendet.

5 Materialien

Tabelle 4: Medien, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Mit Medium ist entweder Agar oder Boullion gemeint. Alle Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 4 °C gelagert. wt/v = *weight/volume*.

Medium	Zusammensetzung	Anwendungsbereich
80% Glycerin	80% (v/v) Glycerin in VE-Wasser	Zur Stammerhaltung
Brain-Heart-Infusion (BHI) + Er150	BHI-Medium mit 150 µg/mL Erythromycin	Selektionsmedium für <i>E. coli</i>
BHI + X-Gal + IPTG + Er150	BHI-Agar mit 1mM IPTG, 0,2 mg/mL X-Gal, 150 µg/mL Erythromycin	Selektionsmedium für Blau-Weiß-Screening von <i>E. coli</i> DH5α
BHI-Agar	BHI-Boullion mit 14 g/L Agar-Agar Kobe	Anzuchtsmedium <i>E. faecalis</i>
GM17	M17-Medium mit 0,5 % (wt/v) Glucose	Anzuchtsmedium für <i>Lactococcus</i> spp.
GM17 + Cat5	GM17-Medium mit 5 µg/mL Chloramphenicol	Selektionsmedium für <i>Lactococcus</i> spp.
GM17 + Er10	GM17-Medium mit 10 µg/mL Erythromycin	Selektionsmedium für <i>Lactococcus</i> spp.
GM17 + Kan100	GM17-Medium mit 100 µg/mL Kanamycin	Selektionsmedium für <i>Lactococcus</i> spp.
GSM17 + Glycin	GM17-Boullion mit 17 % (wt/v) Saccharose und variablen Prozent Glycin	Anzuchtsmedium für elektrokompente <i>Lactococcus</i> spp.
Luria-Bertani (LB)	Nach Herstellerangaben	Anzuchtsmedium für <i>E. coli</i>
LB + Cat25	LB-Medium mit 25 µg/mL Chloramphenicol	Selektionsmedium <i>E. coli</i>
LB + DAP	LB-Medium mit 0,3 mM DAP	Anzuchtsmedium <i>E. coli</i>
LB + Kan50	LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin	Selektionsmedium <i>E. coli</i>
MC-Boullion	A) 4,4 g Milchpulver in 500 mL Reinstwasser B) 5 g Glucose, 8 g Trinatriumcitrat-Dihydrat, 1 g Hefeextrakt in 500 mL Reinstwasser, getrennt autoklavieren und dann 1:1 zusammengeben	Fermentationsmedium für <i>Lactococcus</i> spp.
XM17	M17-Medium mit 0,5% (wt/v) Xylose	Anzuchtsmedium für <i>Lactococcus</i> spp.
XSM17 + 1 % Glycin	XM17-Boullion mit 17% Saccharose (wt/v) und 1% (wt/v) Glycin	Anzuchtsmedium für <i>Lactococcus</i> spp.
Flüssigmedien für elektrokompente Zellen		
10 % Glycerin	10 % (v/v) Glycerin in VE-Wasser	Waschmedium für <i>E. coli</i> DH5α vor der Elektroporation
Recovery-Medium	7,63 g Saccharose 1 mL 2 M MgCl ₂ -Lösung 40 µL 5 M CaCl ₂ -Lösung ad 100 mL GM17-Medium (Lagerung bei -20 °C)	Aufnahmemedium von <i>Lactococcus</i> spp. nach der Elektroporation
SOC-Medium	10 g Pepton aus Casein 2,5 g Hefeextrakt 0,25 g NaCl 5 mL 0,25 M KCl-Lösung 2,5 mL 2 M MgCl ₂ -Lösung 10 mL 1 M Glucose-Lösung ad 500 mL VE-Wasser (Lagerung bei -20 °C)	Aufnahmemedium von <i>E. coli</i> DH5α nach der Elektroporation
Wash-Medium	10 % Glycerin-Lösung mit 17 % (wt/v) Saccharose	Waschmedium für <i>Lactococcus</i> spp. vor der Elektroporation

5.3 Bakterienstämme sowie Primer, Plasmide und Spacer

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 6 dargestellt.

5 Materialien

Tabelle 5: Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bakterienstamm	Charakteristika	Quelle	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F</i> ⁻ φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44Δ- thi-1 gyrA96 relA1</i> , Subklonierungswirt und Quelle für Plasmid pCas9	AG Weiß Labor	Grant et al. (1990)
<i>E. coli</i> JM110 pTRKH2	Quelle für Plasmid pTRKH2	Addgene, Watertown, Massachusetts, USA	Yanisch-Perron et al. (1985)
<i>E. coli</i> Stbl3 pMSP3535VA	Quelle für Plasmid pMSP3535VA	Addgene, Watertown, Massachusetts, USA	Al-Allaf et al. (2012)
<i>E. coli</i> WM3064	<i>RP4 (tra)</i> im Chromosom, <i>DAP</i> ⁻ , Subklonierungswirt	AG Weiß Labor	Dehio & Meyer (1997)
<i>E. faecalis</i> ATCC14506	Quelle für Rekombinase RecT	Leibnitz-Institut DSMZ, Braunschweig, Deutschland	Kandler et al. (1968)
<i>L. cremoris</i> LTH 7122	Isoliert aus Starterkultur	AG Weiß Labor	Forler et al. (2021)
<i>L. cremoris</i> MG1363 pNZ8048	Quelle für Plasmid pNZ8048	Prof. Dr. Charles Franz	Wegmann et al. (2007)
<i>L. cremoris</i> NZ9000	<i>L. cremoris</i> MG1363 Derivat, <i>pepN::nisRK</i> , plasmidfrei	AG Weiß Labor	Kuipers et al. (1998)
<i>L. cremoris</i> NZ9000* <i>codY</i>	Punktmutation des <i>codY</i> -Gens zu Stop-Codon an Position 35	Diese Arbeit	-
<i>L. cremoris</i> NZ9000* <i>oppD</i> Bind	Punktmutation der <i>CodY</i> Bindestelle vor dem <i>oppD</i> -Gen	Diese Arbeit	-
<i>L. lactis</i> LTH 3882	<i>L. lactis</i> II1403, Quelle des Plasmid pGK12, Quelle des Xylose Promotors	AG Weiß Labor	Bolotin et al. (2001)
<i>L. lactis</i> LTH 7123	Isoliert aus Starterkultur	AG Weiß Labor	Forler et al. (2021)

Tabelle 6: Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet oder hergestellt wurden. Cat^r= Chloramphenicol-Resistenz, Er^r= Erythromycin-Resistenz, Kan^r= Kanamycin-Resistenz.

Plasmide	Besonderheit	Herausgeber/Literatur
pCas9	CRISPR-Cas9 Kasette mit <i>Spacer</i> Option, Cat ^r , p15A ori	Luciano Marraffini (Addgene Plasmid #42876) / (Jiang et al., 2013)
pGK12	Cat ^r , pVW01 ori	Prof. DI Dr. Agnes Weiß / (Kok et al., 1984)
pMSP3535VA	<i>Shuttle</i> -Vektor, Kan ^r , VA380-Rep	Gary Dunn (Addgene Plasmid #46887) / (Bryan et al., 2000)

5 Materialien

Tabelle 6 (Fortsetzung): Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet oder hergestellt wurden. Cat^r= Chloramphenicol-Resistenz, Er^r= Erythromycin-Resistenz, Kan^r= Kanamycin-Resistenz.

Plasmide	Besonderheit	Herausgeber/Literatur
pNZ8048	Lactococcus-Vektor <i>PnisA</i> , Cat ^r , pSH71 ori	Prof. Dr. Charles Franz / (Kuipers et al., 1998)
pNZ9530	Er ^r , pAMβ1 ori	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH/ (Kleerebezem et al., 1997)
pTRKH2	<i>Shuttle</i> -Vektor zu Gram-positiven Bakterien, Er ^r , pAMβ1 ori, p15A ori	Rodolphe Barrangou & Todd Klaenhammer (Addgene Plasmid #71312) / (O'Sullivan & Klaenhammer, 1993)
Hergestellte Plasmide in dieser Arbeit		
p428.1D	1D217 <i>Spacer</i> in in CRISPR-Cas9 Kasette auf pCas9	Hergestellt in dieser Arbeit
p428.25A	25A-S620 <i>Spacer</i> in CRISPR-Cas9 Kasette auf pCas9	Hergestellt in dieser Arbeit
p428.2D	2D217 <i>Spacer</i> in in CRISPR-Cas9 Kasette auf pCas9	Hergestellt in dieser Arbeit
p428.3H	3H281 <i>Spacer</i> in in CRISPR-Cas9 Kasette auf pCas9	Hergestellt in dieser Arbeit
p428.oppDBind1	oppDBind1 <i>Spacer</i> in CRISPR-Cas9 Kasette auf pCas9	Hergestellt in dieser Arbeit
pNZrecTGV	pNZ8048 Rückgrat mit Xylose Promotor und <i>recT</i>	Hergestellt in dieser Arbeit
pNZrecTLR	pNZ8048 Rückgrat mit 6 AS vor Startcodon vor <i>recT</i>	Hergestellt in dieser Arbeit
pNZrecTPG	pNZ8048 Rückgrat ohne 6 AS vor Startcodon vor <i>recT</i>	Hergestellt in dieser Arbeit
pTRCas9	CRISPR-Cas9 Kasette auf pTRKH2 ohne <i>Spacer</i>	Hergestellt in dieser Arbeit
pTRCas9.25A	pTRKH2 Rückgrat mit CRISPR-Cas9 Kasette und 25A-S620 <i>Spacer</i>	Hergestellt in dieser Arbeit
pTRCas9codY3	pTRKH2 Rückgrat mit CRISPR-Cas9 Kasette und codY3 <i>Spacer</i>	Hergestellt in dieser Arbeit
pTRCas9codYLR	pTRKH2 Rückgrat mit CRISPR-Cas9 Kasette und codYLR <i>Spacer</i>	Hergestellt in dieser Arbeit
pTRCas9gal	pTRKH2 Rückgrat mit CRISPR-Cas9 Kasette und gal <i>Spacer</i>	Hergestellt in dieser Arbeit
pTRCas9oppDBind1	pTRKH2 Rückgrat mit CRISPR-Cas9 Kasette und oppDBind1 <i>Spacer</i>	Hergestellt in dieser Arbeit

5 Materialien

Tabelle 6 (Fortsetzung): Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet oder hergestellt wurden. Cat'= Chloramphenicol-Resistenz, Er'= Erythromycin-Resistenz, Kan'= Kanamycin-Resistenz.

Plasmide	Besonderheit	Herausgeber/Literatur
Hergestellte Plasmide in dieser Arbeit		
pTRCas9oppDBind2	pTRKH2 Rückgrat mit CRISPR-Cas9 Kasette und oppDBind2 <i>Spacer</i>	Hergestellt in dieser Arbeit
pTRCas9PstI	CRISPR-Cas9 Kasette auf pTRKH2 mit zusätzlicher genomischer DNA von <i>E. coli</i>	Hergestellt in dieser Arbeit

Die Primer, die Oligonukleotide für die *Spacer* und die Reparatur-Templates wurden durch Eurofins Genomics (Konstanz, Deutschland) synthetisiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet. Bei der Schmelztemperatur handelt es sich um die von Eurofins Genomics angegebene Schmelztemperatur der Primer. Die *Spacer* und die Reparatur-Templates, die in dieser Arbeit genutzt wurden, sind in den Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 7: Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Restriktionsschnittstellen sind kleingeschrieben, Überlappungsbereiche der Primer des NEBuilder® HiFi DNA Assembly (HiFi-Assembly) mit dem Vektor sind unterstrichen, Anlagerungsbereiche der Mutagenese-Primer sind ebenfalls unterstrichen, T_m = Schmelztemperatur.

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung	T _m [°C]
616V	AGAGTTTGATYMTGGCTCA	16S-rRNA Nachweis (Chenoll et al., 2011)	52,4
630R	AAGGAGGTGATCCARCC	16S-rRNA Nachweis (Chenoll et al., 2011)	54,0
A51	GGTAATGATTGTTGGCTTGGC	Nachweis von Pxy/T <i>L. lactis</i> LTH 3882 (Miyoshi et al., 2004)	57,9
A52	GACCAAAACGGTCACTCATTGG	Nachweis von Pxy/T <i>L. lactis</i> LTH 3882 (Miyoshi et al., 2004)	60,3
CodY_Fw	GATTGTCTATCTGCCTCGTGTAG	Um Mutation bei <i>codY</i> nachzuweisen	60,6
CodY_Rev	GCAACTCGCCCTTCGTATTA	Um Mutation bei <i>codY</i> nachzuweisen	57,3
gal-tF	TTGACTTAGATGATGTTGA	Um Mutation bei <i>gal</i> nachzuweisen (Guo et al., 2019)	48
gal-tR	ACTTCGTAATCATCTTTTA	Um Mutation bei <i>gal</i> nachzuweisen (Guo et al., 2019)	45,9
Hifi_Test_Fw	TCTAATGTCACTAACCTGCCC	Nachweis Promotor auf pNZ8048	57,9
Insert_recT_Fw	CGATAACGCGAGCATAATAAAC	<i>recT</i> Insert auf pNZ8048	56,5
Insert_recT_Rv	CATCGCCTTCTCTTACTACAAC	<i>recT</i> Insert auf pNZ8048	58,4
InsertCas9_Fw	CCCTCAATCAAAAAATGACCAC	Cas9 Insert auf pTRKH2	56,5
M13/pUC Forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	Nachweis von Insert bei pTRKH2 (Universalprimer)	62,4

5 Materialien

Tabelle 7 (Fortsetzung): Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Restriktionsschnittstellen sind kleingeschrieben, Überlappungsbereiche der Primer des NEBuilder® HiFi DNA Assembly (HiFi-Assembly) mit dem Vektor sind unterstrichen, Anlagerungsbereiche der Mutagenese-Primer sind ebenfalls unterstrichen, T_m = Schmelztemperatur.

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung	T _m [°C]
M13/pUC Reverse	AGCGGATAACAATTTACACAGG	Nachweis von <i>Insert</i> bei pTRKH2 (Universalprimer)	58,9
NrecT_PstI	ACActgcagAGATGAGTAATGATTAAACACAGGT	Klonierung <i>recT</i> <i>E. faecalis</i> ATCC14506	65,8
oppD_Bind_Fw	GCCTTGAAGATGATTACGCT	Um Mutation der codY Bindestelle vor <i>oppD</i> nachzuweisen	55,2
oppD_Bind_MAMAF	TTTTGCTTTACCTTTATTTTCGCGTATTT	Mutagenese-Primer codY Bindestelle vor <i>oppD</i> für MAMA-PCR	57,8
oppD_Rev	TAAGCGCAGTGAGTGGATT	Um Mutation der codY Bindestelle vor <i>oppD</i> nachzuweisen	55,2
pCas9Sp_Fw	GGAActCAACAAGTCTCAGTG	Nachweis <i>Spacer</i> in pCas9	57,9
pCas9Sp_Rv	CAGCTAGGAGGTGACTGAAG	Nachweis <i>Spacer</i> in pCas9	59,4
pNZ8048_Fw	AGATCTAGTCTTATAACTATACTGACAATAG	Nachweis <i>Insert</i> auf pNZ8048	60,2
pNZ8048_fwd_Hifi_5A S	TATCCTTTCTGAAGAGCTCAAGCTTTCTTTG AAC	HiFi-Assembly Primer um Rückgrat von pNZ8048 zu generieren	65,9
pNZ8048_Rev	TTGCCGAAAATATGCACTCGAGAAG	Nachweis <i>Insert</i> auf pNZ8048	61,3
pNZ8048_rev_Hifi_5A S	ATCATTACTCATGGTGAGTGCCTCCTTATA ATTTATTT	HiFi-Assembly Primer um Rückgrat von pNZ8048 zu generieren	65,1
prtP_rev	ACAGTCACATTGGCGAAAGT	Nachweis <i>prtP</i> (Forler et al., 2021)	55,2
pUCM13-52	GCTGCAAGGCGATTAAGTTG	Nachweis von <i>Insert</i> bei pTRKH2 (Universalprimer)	57,3
pUCM13-rev-157	TGCTTCCGGCTCGTATGTTG	Nachweis von <i>Insert</i> bei pTRKH2 (Universalprimer)	59,4
pXylt_RBS_Fw	TCAGTCagatctCTAATTA AAACTGCTCTTACA TA	Klonierung von PxyIT <i>L. lactis</i> LTH 3882	63,6
pXylt_RBS_Rev	CAGTCActgcagAACTCCTTAATTTTATTTGCA A	Klonierung von PxyIT <i>L. lactis</i> LTH 3882	64,8
recT_Fw_Guo_long	AActgcagAGATGAGTAACGATTTAACACAAA TGACACAAC	Klonierung <i>recT</i> <i>E. faecalis</i> ATCC14506	68,4
recT_fwd_Hifi_5AS	GGACTCACCATGAGTAATGATTTAACACA GGTGAC	HiFi-Assembly Primer um <i>recT</i> aus pNZrecTLR zu generieren	69,5
recT_RBS_Fw	TTAGGGGCTAGACAAGAACC	Vor RBS von <i>recT</i> <i>E. faecalis</i> ATCC14506	57,3
recT_rev_Hifi_5AS	AAGCTTGAGCTCTTCAGAAAGGATAATCGT CTC	HiFi-Assembly Primer um <i>recT</i> aus pNZrecTLR zu generieren	67,1
RecT-Rv-XbaI	CTGtctagaTCAGAAAGGATAATCGTCTTCTT C	Klonierung <i>recT</i> <i>E. faecalis</i> ATCC14506	65,8
Rep_Test_Fw	GAAAGAGGGTTAATACCAGCAG	Reparatur-Template auf pTRCas9.25A	58,4
Rep_Test_Rv	TTCTAGCATTCGCCATTCAG	Reparatur-Template auf pTRCas9.25A	55,2

5 Materialien

Tabelle 7 (Fortsetzung): Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Restriktionsschnittstellen sind kleingeschrieben, Überlappungsbereiche der Primer des NEBuilder® HiFi DNA Assembly (HiFi-Assembly) mit dem Vektor sind unterstrichen, Anlagerungsbereiche der Mutagenese-Primer sind ebenfalls unterstrichen, T_m = Schmelztemperatur.

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung	T _m [°C]
S618G-MAMAF3	ACAAATATGTCTGGTACG <u>GG</u>	Mutagenese-Primer für Glycin an Position 618 bei <i>L. lactis</i> LTH 7123 für MAMA-PCR <i>prtP</i>	55,2
S620A-MAMAF2	TAAATGGTGAGGCCAT <u>AG</u> <u>CGTATT</u>	Mutagenese-Primer für Serin620 zu Alanin620 in LTH 7122 und PAM Sequenz an Gly618 (GGT) zu Asn618 (AAT) für MAMA-PCR <i>prtP</i>	61,3
S620A-MAMAF21	TAAATGGTGAGGCCAT <u>AGC</u>	Auf LTH 7122 <i>prtP</i> Sequenz angepasst, für Alanin (GCT) statt Serin an Position 620 für MAMA-PCR	54,5
S620G-MAMAF22	TAAATGGTGAGGCCATT <u>CC</u>	Mutagenese-Primer für Glycin statt Serin an Position 620 bei LTH7122 für MAMA-PCR <i>prtP</i>	54,5
S620S-MAMAF1	GTCAGTCGCTGATGTATAAACG	Wildtyp-Primer Forward für MAMA-PCR <i>prtP</i>	58,4
S620S-MAMAF11	GTCAGTCGCTGATGTATAAACGG	Wildtyp-Primer Forward für MAMA-PCR	60,6
S620S-MAMAF2	GGTGAGGCCATTGACGTTT <u>ATT</u>	Mutagenese-Primer für Stopcodon an 617 und 618 für MAMA-PCR <i>prtP</i>	58,4
S620S-MAMAR	GGAAACCATTTCAGCTTTCAAGC	Wildtyp-Primer Reverse für MAMA-PCR <i>prtP</i>	58,4
9.2-6F	GGTGGAgatctACGAAATCATCCTGTGGAGCTT	Klonierung von pCas9 Insert auf pTRKH2	69,5
9.2-6R	GGTGGActgcagATCACACTACTCTTCTTTTG	Klonierung von pCas9 Insert auf pTRKH2	68,2

Tabelle 8: *Spacer* für die CRISPR-Cas9 Kassette, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die zugehörige PAM-Sequenz im Gen ist ebenfalls dargestellt.

Spacer	Sequenz 5'→3'	Zielregion	PAM
1D217	TGAAGGCACAGTTGTCTCGGTTATTGACAG	<i>prtP</i> (D217)	TGG
25A-S620	ACAACAATGGCTACACAAATATGTC	<i>prtP</i> (S620)	TGG
2D217	AGTGGCATTGATCCAACACATAAAGACATG	<i>prtP</i> (D217)	CGG
3H281	TTTCAGCAACTCTGACACTTCTGCAAAAAC	<i>prtP</i> (H281)	CGG
codY3	CCATACAACAGTATGACTGAACGCT	<i>codY</i>	TGG
codYLR	TCGGTCACTCCATCTTGCAAAATCG	<i>codY</i>	CGG
gal (Guo et al., 2019)	TTCTCTGCTTGAAGTGGTTCAATT	<i>gal</i>	GGG
oppDBind1	TTATTTTCGCGTAATGTTTCAGAAAAT	Bindestelle CodY vor <i>oppD</i>	AGG
oppDBind2	ATTTTCTGAACATTACGCGAAATAA	Bindestelle CodY vor <i>oppD</i>	AGG

Tabelle 9: Reparatur-Templates, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Restriktionsüberhangsequenzen für das Klonieren in die entsprechenden Schnittstellen sind kleingeschrieben, die eingeführten Mutationen unterstrichen.

Reparatur-Template	Sequenz 5'→3'	Funktion
galk0	GGAGTTGACACCAATATAATCATTTTCTGTTTT TTGTTTGGTTGAACCAAGTTCAGAGGAA CACTTAGCTTAAATA	Test Reparatur-Template aus Literatur (Guo et al., 2019)
Repair_codY3	GTATTAATCACGCAGGCGTTGCAATCAATGAC GTTTGATTAACGTTCACTACTGTTGTATGG CAACTCTTGTGCAA	Reparatur-Template mit einer Mutation der <i>codY</i> -Sequenz, die zu einem Stop-Codon an Position 35 (Ileu35→Stop) und gleichzeitige Mutation der PAM von <i>Spacer codY3</i>
Reparatur_codY_LR	AAAGTGGCTACATTACTTGAAAAACACGTAA AATCATAATAATTTTGCAAGATGGAGTGACCG ATTTGCAACAAGAGTT	ssDNA mit einer Mutation der <i>codY</i> -Sequenz, die zu einer Aminosäuresubstitution an den Positionen 12 und 13 zu Isoleucin (Thr12/Ala13→Ile) führt
Reparatur_oppD	TTCCTCCAAAACCTTTTGCTTTACCTTTATTTG CGTAITTTTTTGAAAATTCATGAACATACCTAA AATAGTAAATTTTTG	ssDNA mit der Mutation ATGTTCA→TTTTTTT der Bindestelle von CodY vor <i>oppD</i>
RepS618Gly	ACGCAAAACAACAATGGCTACACAAATATGTC TGGTACGGGAATGGCCTCGCCATTTATTGCCG GTTCAACAAGCATTGTT	ssDNA mit einer Punktmutation (Ser618→Gly) angepasst auf <i>L. lactis</i> LTH 7123 Sequenz.
RepS620_FW_Gly	tcgacTCTGGTCAACGCAAAACAACAATGGCTA CACAAATATGTCTAATACGGGTATGGCCTCGC CATTTATTGCCGGTTCACAACgat	<i>Forward</i> -Strang eines Reparatur-Templates mit einer Punktmutation (Ser620→Gly), und gleichzeitige Mutation der PAM von <i>Spacer 25A-S620</i> flankiert von <i>Sall</i> - und <i>PvuI</i> -Restriktionsüberhängen
RepS620_FW_Stop	tcgacTCTGGTCAACGCAAAACAACAATGGCTA CACAAATATGTAAATAACGTCAATGGCCTCGC CATTTATTGCCGGTTCACAACgat	<i>Forward</i> -Strang eines Reparatur-Templates mit zwei Stop-Codons (Ser617/Gly618→Stop) und gleichzeitige Mutation der PAM von <i>Spacer 25A-S620</i> , flankiert von <i>Sall</i> - und <i>PvuI</i> -Restriktionsüberhängen
RepS620_RV_Gly	cgTTGTGAACCGGCAATAAATGGCGAGGCCAT ACCGGTATTAGACATATTTGTGTAGCCATTGTT GTTTTGCGTTGACCAGag	<i>Reverse</i> -Strang eines Reparatur-Templates mit einer Punktmutation (Ser620→Gly) und gleichzeitige Mutation der PAM von <i>Spacer 25A-S620</i> , flankiert von <i>Sall</i> - und <i>PvuI</i> -Restriktionsüberhängen.
RepS620_RV_Stop	cgTTGTGAACCGGCAATAAATGGCGAGGCCAT TGACGTTTATTACATATTTGTGTAGCCATTGTT GTTTTGCGTTGACCAGag	<i>Reverse</i> -Strang eines Reparatur-Templates mit zwei Stop-Codons (Ser617/Gly618→Stop) und gleichzeitige Mutation der PAM von <i>Spacer 25A-S620</i> , flankiert von <i>Sall</i> - und <i>PvuI</i> -Restriktionsüberhängen
RepS620Ala	TCTGGTCAACGCAAAACAACAATGGCTACACA AATATGTCTAATACGGCTATGGCCTCGCCATT TATTGCCGGTTCACAA	ssDNA mit einer Punktmutation (Ser620→Ala oder Ser618→Ala) und gleichzeitige Mutation der PAM von <i>Spacer 25A-S620</i>
RepS620GlyX	TCTGGTCAACGCAAAACAACAATGGCTACACA AATATGTCTGGTACGGGAATGGCCTCACCATT TATTGCCGGTTCACAA	ssDNA mit einer Punktmutation (Ser620→Gly) angepasst auf <i>L. cremoris</i> LTH 7122 Sequenz
RepS620Stop	TCTGGTCAACGCAAAACAACAATGGCTACACA AATATGTAAATAACGTCAATGGCCTCGCCATT ATTGCCGGTTCACAA	ssDNA mit einer Punktmutation (Ser620→Stop) und gleichzeitige Mutation der PAM von <i>Spacer 25A-S620</i>

6 Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten allgemeinen molekularbiologischen Methoden sind im Anhang im Kapitel *III. Allgemeine Verfahren* zusammengestellt. Diese Methoden wurden, sofern nicht anders angegeben, standardmäßig angewendet. Abweichungen von den beschriebenen Verfahren werden im jeweiligen Abschnitt erläutert.

6.1 Stammhaltung und Übernachtskulturen

Zur Herstellung einer Übernachtskultur (ÜK) wurden 10 mL einer Flüssigkultur gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Kolonie des jeweiligen Stammes inokuliert und das Medium 16 h inkubiert. Für *Lactococcus* spp. wurde das Medium bei 30 °C statisch inkubiert. Für *E. coli* Stämme wurde das Medium bei 37 °C bei 180 Rotationen pro Minute (englisch: *rotations per minute*, rpm) inkubiert.

Für die Stammhaltung von *E. coli* wurde das Zellpellet von 1 mL ÜK durch Zentrifugation bei $2348 \times g$ für 10 min geerntet und anschließend mit 500 µL frischer Boullion (LB oder BHI) gemischt. Anschließend wurden 500 µL 80 % Glycerin-Lösung dazugegeben und gemischt. Die Glycerol-Stocks wurden bei -80 °C gelagert. Zur kurzzeitigen Stammhaltung wurden die jeweiligen Stämme jede Woche auf eine neue Agarplatte fraktioniert ausgestrichen. *E. coli* Agarplatten wurden standardmäßig 16 h bei 37 °C bebrütet.

Zur Stammerhaltung von *Lactococcus* spp. wurde von 2 mL ÜK ein Zellpellet durch Zentrifugation bei $2348 \times g$ für 10 min gewonnen und mit 500 µL frischer GM17-Boullion versetzt und anschließend wie bei der Stammhaltung von *E. coli* verfahren. *Lactococcus* spp. Agarplatten wurden standardmäßig 40 h bei 30 °C bebrütet.

6.1.1 Inkubation in Milchcitrat-Boullion

Für die Fermentation mit Milchcitrat-Boullion (MCB) wurde eine ÜK in MCB erstellt und jeweils eine Kolonie der jeweiligen *L. cremoris* NZ9000 Mutante für 16 h bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde durch Ausplattieren der zuvor bestimmten Verdünnungsstufen die Keimzahl bestimmt. Es wurden biologische Triplikate und technische Duplikate verwendet. Die Platten wurden für 2 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend die Kolonie-bildenden-Einheiten (KbE) ausgezählt und der dekadische Logarithmus ($\log_{10}$) dieser berechnet.

6.1.2 Messung der optischen Dichte

Zur Messung des Wachstums einer Kultur wurde die optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) mit einem Photometer gemessen. Von der Kultur wurde 1 mL entnommen und bei $6010 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL PBS resuspendiert und bei einer zu erwartenden OD_{600} von 0-1 direkt in die Küvette überführt, oder bei einer zu erwartenden OD_{600} von über 1

erst 1:10 in PBS verdünnt und anschließend in die Küvette überführt. Als Leerwert wurde 1 mL PBS verwendet.

6.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen und Elektroporation

Elektrokompetente *E. coli* DH5 α Zellen wurden wie folgt hergestellt: Eine ÜK aus 10 mL LB-Boullion wurde angesetzt und bei 37 °C und 180 rpm 16 h inkubiert. Danach wurden 10 mL frische LB-Boullion mit einer OD₆₀₀ von 0,01 aus der ÜK angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 unter denselben Bedingungen inkubiert.

Anschließend wurden die warmen Kolben direkt aufs Eis gegeben und auf dem Eis die Kultur abgekühlt. Die Kultur wurde in gekühlte Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen bei 3234 $\times g$ bei 4 °C für 10 min geerntet. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in 3 mL sterilem Reinstwasser gewaschen und erneut für 5 min bei 3234 $\times g$ und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal mit sterilem Reinstwasser und ein drittes Mal mit steriler 10 % Glycerin-Lösung wiederholt. Danach wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 50 μ L steriler 10 % Glycerin-Lösung resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

Standardmäßig wurden 50 μ L der elektrokompetenten *E. coli* DH5 α Zellen elektroporiert. Dafür wurde das Zellpellet aus den 50 μ L auf Eis aufgetaut und anschließend das zu elektroporierende Plasmid oder der Ligationsansatz hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach wurde das Gemisch in eine gekühlte 1 mm-Spalt-Elektroporationsküvette überführt und mit dem Programm EC1 des *MicroPulsers* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) behandelt (2 kV, 5 ms Dauer). Danach wurde sofort 1 mL auf 37 °C erwärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben und diese 30 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert, bevor sie auf LB-Agarplatten oder BHI-Agarplatten ausplattiert wurden. Standardmäßig wurden 100 μ L des Elektroporationsansatzes pro Agarplatten aufgetragen.

6.2.1 Blau-Weiß Screening von transformierten *E. coli* DH5 α

Es wurden BHI-Agarplatten (BHI + X-Gal + IPTG + Er150) mit Erythromycin, IPTG und X-Gal wie in Tabelle 4 angefertigt. Die Transformationsansätze wurden auf diese Platten ausplattiert. Nach ein bis drei Tagen wurde die Farbe der Kolonien kontrolliert. Bei unklarem Farbausschlag wurden die Kolonien auf eine neuen Platte BHI + X-Gal + IPTG + Er150 übertragen und erneut für bis zu drei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei 4 °C gelagert und nach einem weiteren Tag wurde die Farbe kontrolliert. Die potenziell rekombinanten Kolonien (weiß) wurden gezählt und überprüft.

6.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* WM3064

Zunächst wurde eine ÜK des Stammes *E. coli* WM3064 in LB-Boullion + DAP durch 16 h Inkubieren bei 37 °C und 180 rpm hergestellt. Anschließend wurde eine neue Kultur mit 250 mL LB-Boullion + DAP mit der ÜK in einem Verhältnis von 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 3234 × g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und mit 75 mL TFB1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 90 min auf Eis inkubiert und dann mit den gleichen Einstellungen erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachfolgend wurde der TBF1-Puffer entfernt und 10 mL TBF2-Puffer hinzugegeben und vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden in 100 µL Aliquoten bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

6.3 Herstellung elektrokompetenter *Lactococcus* spp. Zellen und Elektroporation

Standardmäßig wurden die Zellen nach dem Protokoll der Firma Eppendorf AG behandelt (Eppendorf AG, 2001), wobei dieses wie folgt modifiziert wurde: Die Zellen wurden in GSM17-Boullion + 1 % Glycin bei 30 °C über Nacht inkubiert und anschließend auf Eis schockgekühlt. Die Zellen aus 10 mL Kultur wurden für 15 min bei 3234 × g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet mit 3 mL Wash-Medium resuspendiert und erneut für 10 min bei 3234 × g und 4 °C zentrifugiert. Dies wurde zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet der 10 mL Kultur 125-fach im Wash-Medium aufkonzentriert und bei -80 °C gelagert.

Es wurden 80 µL der elektrokompetenten Zellen elektroporiert. Dafür wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und anschließend das zu elektroporierende Plasmid oder der Ligationsansatz hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach wurde das Gemisch in eine gekühlte 1 mm-Spalt-Elektroporationsküvette überführt und bei 2 kV für 5 ms Dauer im *MicroPulser* behandelt. Nachfolgend wurde sofort 1 mL 30 °C warmes *Recovery*-Medium zu den Zellen gegeben und diese 2 h bei 30 °C inkubiert, bevor sie auf Agarplatten ausplattiert wurden. Standardmäßig wurden 100 µL des Elektroporationsansatzes pro Agarplatten aufgetragen.

6.3.1 Nisin-Induzierung nach Guo et al.

Für die Induzierung mit Nisin wurden verschiedene Optionen getestet. Da das in dieser Arbeit verwendete Plasmid-System an das der Autoren Guo et al. (2019) angelehnt ist, wurde für die erste Option gleichermaßen verfahren: Für die Nisin-Induzierung wurde *L. cremoris* NZ9000, welcher entweder pNZrecTLR oder pNZrecTPG trägt, in GM17-Boullion + Cat5 über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1:100 in GSM17-Boullion + Cat5 + 1% Glycin verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 bei 30 °C inkubiert. Die OD₆₀₀ Messung erfolgte aus

einer Referenzkultur mit der analog verfahren wurde. Dann wurden die Kulturen mit 10 ng/ μ L Nisin induziert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen wie in Abschnitt 6.3 beschrieben hergestellt. Die Induzierung wird im Weiteren „Induzierung nach Guo et al.“ genannt. Die Bezeichnung der Zellen erfolgt mit „Guo“ als Kürzel.

6.3.2 Nisin-Induzierung nach Berlec et al.

Eine weitere Option, die in dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Induzierung nach Berlec et al. (2018): Es wurde eine ÜK des *L. cremoris* NZ9000, welcher pNZrecTPG trägt, in GM17-Boullion + Cat5 angesetzt und diese nach Inkubation für 16 h bei 30 °C 1:50 in frischer GM17-Boullion + Cat5 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 30 °C inkubiert. Dann wurde die Kultur 1:20 in GSM17-Boullion + Cat5 + 1 % Glycin verdünnt und mit 20 ng/mL Nisin induziert. Die Kultur wurde weitere 3 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Abschnitt 6.3 beschrieben zur Elektroporation vorbereitet. Diese Zellen werden im Folgenden „Berlec 20“ genannt.

Bei einer weiteren Variante wurde eine ÜK von *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTPG in GM17-Boullion + Cat5 nach 16 h bei 30 °C 1:50 in frischer GSM17-Boullion + Cat5 + 1 % Glycin verdünnt. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,98 bei 30 °C inkubiert, dann wurde die Kultur 1:20 in GSM17-Boullion + Cat5 + 1 % Glycin verdünnt mit 10 ng/mL Nisin induziert und für 16 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden elektrokompente Zellen aus der ÜK gewonnen, wie unter Abschnitt 6.3. beschrieben. Diese Zellen werden im Weiteren „Berlec long“ genannt.

6.3.3 Elektroporation in Starterkulturen

Standardmäßig wurde bei den Starterkulturstämmen *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 wie bei *L. cremoris* NZ9000 verfahren, um diese elektrokompent zu machen. Dafür wurde das unter Abschnitt 6.3 beschriebene Verfahren angewendet.

Es wurde versucht, folgende Vektoren mit verschiedenen Konzentrationen in die elektrokompenten Starterkulturstämmen zu transformieren: pTRCas9.25A, pTRCas9.25AGly, pNZ8048, pTRKH2, pGK12, pNZ9530 und pMSP3535VA. Die verschiedenen Ansätze wurden entsprechend der Antibiotika-Resistenzen, die auf den Plasmiden kodiert sind, auf GM17 + Er10, GM17 + Cat5 oder GM17 + Kan100 Agarplatten ausplattiert und die Platten bis zu drei Tage bei 30 °C inkubiert. Es wurde immer der gesamte Elektroporationsansatz ausplattiert, sodass die Anzahl der Transformanten der Gesamtanzahl aller Transformanten aus dem Ansatz entspricht. Bei den Vektoren pGK12, pNZ9530 und pMSP3535VA wurde der komplette Ansatz auf einer Agarplatte ausplattiert, sodass die Tendenz der Transformationseffizienz anhand des Plattenbewuchses festgestellt werden konnte.

6.3.4 Bestimmung der Glycin-Toleranz der Starterkulturstämme

Da durch Verwendung des gleichen Protokolls wie für *L. cremoris* NZ9000 keine positiven Transformanten erzeugt werden konnten, wurde eine Optimierung der Transformierbarkeit durch Anpassung des Glycin-Gehaltes untersucht: Dafür wurden die elektrokompenten Zellen nach dem Protokoll von Holo & Nes (1989) angefertigt: Zur Bestimmung der Glycin Toleranz der beiden Starterkulturstämme wurde eine Kolonie des jeweiligen Stammes von einer GM17-Agarplatte in eine Vorkultur bestehend aus GM17-Boullion gegeben. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 wurde die Kultur 1:100 verdünnt und für 16 h bei 30°C in GSM17-Boullion mit verschiedenen Glycingehalten inkubiert. Die getesteten Glycingehalte enthielten 0, 1, 2, 3, und 4 % Glycin-Anteil in der Boullion. Anschließend wurde die OD₆₀₀ der Kultur gemessen. Hierfür wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Glycin-Wert, bei dem die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,2-0,7 hatten, wurde anschließend als angepasster Wert für die Verwendung in GSM17-Boullion verwendet und die Zellen daraus elektrokompent gemacht, wie unter Abschnitt 6.3 beschrieben.

6.4 Erstellung der Oligonukleotide als *Spacer* für die CRISPR-Cas9 Kasette

Damit die sgRNA des CRISPR-Cas9 Plasmids abgelesen werden konnte, musste die Sequenz zum Ablesen der crRNA ein bestimmtes Format haben. Die Sequenz zum Erstellen der crRNA, die in die CRISPR-Cas9 Kasette eingefügt wurde, wird in dieser Arbeit als *Spacer* betitelt und bezeichnet den Bereich auf der crRNA, der an den Protospacer-Bereichen der Ziel-DNA bindet. Zur Erstellung der *Spacer* wurde das Programm CRISPOR (Concordet & Haeussler, 2018) verwendet, welches die eingegebene Ziel-Sequenz nach PAM-Stellen durchsucht und das hinterlegte Referenzgenom auf *Off-Target*-Effekte untersucht. Anschließend wurden die gefundenen PAM-Stellen farblich nach grün, entsprechend gut, und rot, entsprechend schlecht, klassifiziert.

Die *Spacer* für das *prtP*-Gen wurden so ausgewählt, dass damit möglichst eine Mutation einer der Aminosäuren der katalytischen Triade durchführbar ist. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die PAM-Stelle möglichst nah an der Ziel-Aminosäure liegt, oder sogar stromabwärts dieser zu finden ist, sodass die Schnittstelle von Cas9 in der Ziel-Aminosäuresequenz vorliegt. Nach dem Protokoll zur Ligation der *Spacer* in pCas9 (Marraffini, 2014) wurden diese auf eine Länge von 25 bp um die jeweiligen Basen erweitert, damit diese in die Schnittstellen BsaI des restringierten Vektors passen. Jeweils zwei Oligonukleotide bilden einen *Spacer*. Somit mussten die Oligonukleotide nicht erneut restringiert werden, sondern mussten nur phosphoryliert und hybridisiert werden, um den finalen *Spacer* zu erhalten. Das verwendete *prtP*-Gen zum Design der *Spacer* ist unter der NCBI Zugangsnummer J04962 abrufbar. Um die Mutation im Genom des Stammes *L. cremoris* NZ9000 vorzunehmen, wurden die *Spacer*

in gleicher Weise designt, indem die nächstliegende PAM-Sequenz durch das Programm CRISPOR ermittelt wurde. Daraufhin wurden die *Spacer* mit den jeweiligen Überhängen ergänzt und synthetisiert.

Zur Herstellung der *Spacer* aus den synthetisierten Oligonukleotiden wurde nach dem Verfahren des bei Addgene hinterlegten Protokolls *protocol for new Spacer cloning in pCas9* (Marraffini, 2014) vorgegangen. Dazu wurde jeweils 1 µL des Oligonukleotids (*Forward* und *Reverse*) mit 5 µL Ligase Puffer und 1 µL T4 Polynukleotidkinase und 42 µL Reinstwasser gemischt und für 30 min bei 37 °C und 1000 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Für die Hybridisierung der Oligonukleotide wurde zu der fertigen Phosphorylierungsreaktion 1 µL einer 1 M NaCl-Lösung gegeben und 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend im *ThermoMixer* (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) mit einer Temperierate von 0,5 °C/min auf 20 °C abgekühlt. Dann wurde der erhaltene *Spacer* 1:10 mit Reinstwasser verdünnt und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

6.5 Erstellung des Plasmids pTRCas9 mit *Spacern*

Zur Erstellung des pTRCas9 Plasmids wurde zunächst die CRISPR-Cas9 Kasette des Vektors pCas9 (Addgene Plasmid #42876) verwendet. Hierfür wurde das Plasmid aus dem von Addgene gelieferten Stamm *E. coli* DH5α mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben mit folgenden Modifikationen isoliert: Für die Isolation wurden vier Mal 4 mL ÜK des Stammes in LB-Boullion + Cat25 zum Aufschluss der Zellen verwendet. Anschließend wurden alle vier Aufschlüsse über eine Säule gegeben, um eine möglichst hohe Konzentration zu erhalten. Zur Elution wurde der EB-Puffer des Kits auf 70 °C erhitzt, 50 µL auf die Säule gegeben und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Bei den ersten Versuchen wurde zunächst das Plasmid pCas9 restringiert, um die *Spacer* einzubringen und anschließend das Konstrukt in den Vektor pTRKH2 kloniert. Im späteren Verlauf wurde die leere CRISPR-Cas9 Kasette in den Vektor pTRKH2 kloniert und anschließend wurden die *Spacer* in den Vektor pTRCas9 kloniert.

6.5.1 Klonierung der *Spacer* auf pCas9

Für den Restriktionsverdau des Vektors pCas9 wurden 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Anschließend wurde das Plasmid mit 100 Units BsaI-HF®v2 inkubiert, wie unter Abschnitt III.1 im Anhang beschrieben. Anschließend wurde eine Reinigung des Restriktionsverdaus mit dem QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Hierzu wurden zwei Ansätze des Restriktionsverdaus gepoolt, sodass mit 10 µg DNA die Reinigung vorgenommen wurde. Die Elution erfolgte mit 30 µL EB-Puffer des Kits, der auf 70 °C erhitzt und 5 min in der Säule

inkubiert wurde. Anschließend wurde das gereinigte Produkt bei -20 °C tiefgekühlt und gelagert.

Zur Ligation der *Spacer* 1D217 und 2D217 in pCas9 wurden jeweils 500 ng des gereinigten und Bsal-HF®v2 geschnittenen Plasmids mit dem entsprechenden Volumen der *Spacer*, 1 µL T4 Ligase Puffer und 1 µL (400 Units) der T4 Ligase versetzt und für 16 h bei 16 °C inkubiert. Es wurde eine 5:1 (*Spacer*:Vektor) und eine 7:1 (*Spacer*:Vektor) Ligation durchgeführt. Das Ligationsprodukt wurde bis zur Elektroporation bei -20 °C gelagert.

Alle weiteren Ligationen in dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders angegeben, mit 1 µL T4 Ligase Puffer und 1 µL T4 Ligase für 16 h bei 16 °C inkubiert. Vektor, *Insert* und gegebenenfalls Reinstwasser wurden entsprechend ergänzt, sodass ein Gesamtvolumen von 10 µL nicht überschritten wurde. Im Anschluss der Ligation erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min. Alle Ligationsprodukte dieser Arbeit wurden bis zur Transformation bei -20 °C gelagert.

Die in Tabelle 10 dargestellten Elektroporationsansätze wurden in elektrokompente *E. coli* DH5α elektroporiert, wie unter Abschnitt 6.2 beschrieben.

Tabelle 10: Elektroporationsansätze zur Ligation der *Spacer* auf pCas9.

Elektroporationsansatz	Menge [ng]	Volumen [µL]
pCas9 Isolat	231	2,23
5:1 Ligation	231	4,62
7:1 Ligation	231	4,62

Die Elektroporationsansätze wurden auf LB + Cat25 Agarplatten ausplattiert. Die Bebrütung der LB + Cat25 Agarplatten erfolgte für 48 h bei 37 °C. Jeweils eine Transformante wurde gepickt und in einer ÜK aus LB-Boullion + Cat25 inkubiert, um die Plasmide zu bestätigen. Aus der ÜK des jeweiligen Transformanten wurde eine Plasmidisolierung mittels QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt und die Plasmidisolierung elektrophoretisch in einem 1%igem Agarosegel bei 100 V für 1,5 h aufgetrennt. Der *Spacer* auf dem Plasmid wurde anschließend mit Sanger-Sequenzierung (MicroSynth, Göttingen, Deutschland) bestätigt. Dafür wurden die Primer pCas9Sp_Fw und pCas9Sp_Rv verwendet. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Sanger- und Gesamt-Plasmid-Sequenzierungen (Englisch: *Full-Plasmid*) wurden von dem Unternehmen MicroSynth (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Die *Spacer* 3H281, 25A-S620 und oppDBind1 wurden anschließend durch das gleiche Verfahren mit einer 5:1 (*Spacer*:Vektor) Ligation auf den Vektor pCas9 kloniert. Die Klonierung der *Spacer* auf den Vektor wurde durch Sequenzierung mit dem Primer pCas9Sp_Rv geprüft.

Von dem jeweiligen *E. coli* DH5α Klon, der das Plasmid p428.1D, p428.25A oder p428.oppDBind1 trug, wurde ein Glycerol-Stock wie in Abschnitt 6.1 beschrieben hergestellt.

6.5.2 Restriktion des Plasmids pTRKH2

Als Vektor-Rückgrat für die CRISPR-Cas9 Kasette wurde der Shuttle Vektor pTRKH2 (Addgene #71312) verwendet. Der Vektor wurde aus 2 mL ÜK des Stammes *E. coli* JM110 isoliert und für einen Restriktionsverdau 4 µg dieses Vektors mit 50 Units PstI und 25 Units BglII in einer 50 µL Gesamtreaktion eingesetzt. Die Restriktion wurde für 1 h bei 37 °C und 1000 rpm durchgeführt. Anschließend wurde der Restriktionsverdau gereinigt und aufkonzentriert, indem zwei Ansätze eines Restriktionsverdaus zusammen mittels QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit aufgereinigt wurden und mit 30 µL EB-Puffer eluiert wurden.

6.5.3 Ligation des pCas9 mit *Spacern* und pTRKH2

Alle PCRs dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders beschrieben, wie in Abschnitt III.2 durchgeführt. Es wurde mit den Plasmiden p428.1D, p428.25A und p428.oppDBind1 fortgefahren. Plasmidisolationen der genannten Plasmide wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Um das *Insert* mit den *Spacern* in pTRKH2 zu klonieren, wurde eine PCR mit der Q5® High-Fidelity-Polymerase (NEB, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt. Es wurden 20 ng Plasmid für eine PCR Reaktion eingesetzt und die Primer 9.2-6F und 9.2-6R. verwendet. Folgendes PCR Programm wurde verwendet (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: PCR Programm zur Amplifikation der CRISPR-Cas9 Kasette von pCas9.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	4:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	69	1:00
	Elongation	72	2:30
1	Finale Elongation	72	2:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 5084 bp (Primer: 9.2-6F, 9.2-6R)			

Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Analyse in einem 1% Agarosegel für 1 h, bei 100 V von 1 µL der Amplifikate. Daraufhin wurde eine Agarosegel-Aufreinigung des Amplifikats mittels QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit durchgeführt. Dafür wurden 25 µL PCR-Volumen auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und 1 h bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt, die Bande wurden ausgeschnitten und anschließend nach Herstellerangaben zur Agarosegel-Aufreinigung verfahren. Um eine präparativ ausreichende Menge zu erhalten, wurden die Banden zweier PCRs aufgereinigt, indem nach Auflösung der Agarose beide über eine Säule eluiert wurden. Das Eluat wurde dann für den Restriktionsverdau verwendet. Dafür wurden 100 Units BglII und 100 Units PstI mit dem Eluat in einer 50 µL Reaktion inkubiert,

anschließend folgte eine Aufreinigung mit dem Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, Frankfurt, Deutschland), wobei mit 6 µL das geringstmögliche Volumen nach Herstellerangaben zur Elution genutzt wurde.

Zur Ligation wurde restringierter und gereinigter pTRKH2 mit 10 pmol zusätzlichem Adenosintriphosphat (ATP) (NEB, Frankfurt, Deutschland) und dem *Insert* mit den *Spacern* 1D217 und 25A-S620 versetzt und wie unter Abschnitt 6.5.1 beschrieben ligiert. Die genauen Mengenangaben an Vektor und die untersuchten Verhältnisse zum *Insert* sind in Tabelle 12 zu sehen.

Tabelle 12: Ligationsansätze der Amplifikate des p428.25A und des p428.1D zur Klonierung in pTRKH2.

Ligationsverhältnis <i>Insert</i> :Vektor und Ursprung des <i>Inserts</i>	Eingesetzte Menge an Vektor [ng]
1:1 mit p428.1D <i>Insert</i>	200
1:1 mit p428.25A <i>Insert</i>	200
2:1 mit p428.1D <i>Insert</i>	200
2:1 mit p428.25A <i>Insert</i>	200
1:1 mit p428.1D <i>Insert</i>	50
2:1 mit p428.1D <i>Insert</i>	50
2:1 mit p428.25A <i>Insert</i>	50
3:1 mit p428.25A <i>Insert</i>	50

Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5α elektroporiert und der gesamte Elektroporationsansatz auf eine Agarplatte zum Blau-Weiß-Screening ausplattiert und wie unter Abschnitt 6.2.1 verfahren. Anschließend wurden die Transformanten gezählt und eine Kolonie-PCR, wie in Abschnitt III.3 beschrieben, mit den Transformanten durchgeführt. Es wurde folgendes Programm verwendet (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: PCR Programm zum Nachweis der CRISPR-Cas9 Kasette auf pTRKH2.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	2:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	69	1:00
	Elongation	68	5:30
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 5209 bp (Primer: M13/pUC Forward, M13/pUC Reverse)			

Die Ergebnisse wurden elektrophoretisch bei 100 V für 1 h und einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde eine Plasmidisolation der nach PCR-Amplifikation positiv interpretierten Kolonien durch das QIAprep Spin Miniprep Kit durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit den Primern pUCM13-52 und pUCM13-rev 157 mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert. Eine *Full-Plasmid*-Sequenzierung von pTRCas9.25A durch MicroSynth wurde durchgeführt.

Beim oppDBind1 wurde zu einem späteren Zeitpunkt wie folgt verfahren: Es wurde ebenso vorgegangen wie bei p428.25A *Insert* und p428.1D *Insert*, außer dass nur eine 2:1 (*Insert*:Vektor) Ligation durchgeführt wurde. Alle anderen Schritte bis zum Screening der Transformanten waren identisch. Zum Screenen der Transformanten von pTRCas9oppDBind1 wurde eine Kolonie-PCR mit 10 Kolonien wie in Abschnitt III.3 und mit dem PCR Programm in Tabelle 14 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 14: PCR Programm der Cas9-*Insert* PCR, um CRISPR-Cas9 *Insert* auf pTRKH2 nachzuweisen mit Taq DNA-Polymerase.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	46	1:00
	Elongation	68	1:20
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 1123 bp (Primer: InsertCas9_Fw, M13/pUC Reverse)			

Nach der PCR folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung mittels 1%igen Agarosegel bei 120 V für 40 min. Von einem positiven Klon wurde eine Plasmidisolation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit angefertigt. Alle Plasmidlösungen dieser Arbeit wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.5.4 Erstellung der Plasmide pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop

Um ein doppelsträngiges Reparatur-Template auf den pTRCas9.25A Vektor einzubringen, wurde ein neuer Vektor mit Reparatur-Template hinter der CRISPR-Cas9 Kasette auf pTRCas9.25A designt. Das Plasmid pTRCas9.25A wurde hierfür mit Pvu-HF® und Sall-HF® nach Standardprotokoll (s. III.1) restringiert und mit dem QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit gereinigt. Zwei Reparatur-Templates wurden hergestellt, indem jeweils der *Forward*- und *Reverse*-Strang durch Eurofins Genomics synthetisiert und anschließend die Oligonukleotide hybridisiert wurden, wie unter Abschnitt 6.4 beschrieben. Es wurden die Oligonukleotide RepS620_FW_Gly und RepS620_RV_Gly für das Reparatur-Template Glycin und die

Oligonukleotide RepS620_FW_Stop und RepS620_RV_Stop für das Reparatur-Template Stop verwendet.

Für die Ligation wurden 237 ng restringierter und gereinigter pTRCas9.25A bei einer 5:1 (*Insert:Vektor*) Ligation mit dem Reparatur-Template S620Gly und S620Stop verwendet. Für die Elektroporation wurden 2 µL des Ligationsansatzes zu 50 µL kompetenter *E. coli* DH5α gegeben und wie unter Abschnitt 6.2 die Elektroporation durchgeführt. Die Zellen eines kompletten Elektroporationsansatzes wurden bei $6010 \times g$ für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, in 100 µL PBS resuspendiert und auf einer BHI + Er150 Agarplatte ausplattiert und für 48 h bei 37 °C bebrütet. Von den beiden Ligationsansätzen wurden je fünf Klone durch Kolonie-PCR (s. III.3) gescreent. Für das Screening wurde folgendes PCR Programm verwendet (s. Tabelle 15):

Tabelle 15: PCR Programm zum Nachweis des Reparatur-Templates auf pTRCas9.25A.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	2:00
30	Denaturierung	95	0:15
	Anlagerung	46	0:30
	Elongation	68	0:15
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: erfolgreiche Klonierung: 223 bp, negativ: 283 bp (Primer: Rep_Test_Fw, Rep_Test_Rv)			

Die Kolonie-PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel (120 V, 30 min) gelelektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet. Anschließend wurde je eine Plasmidisolation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit eines positiven Klons pro Ligationsansatz per Sanger-Sequenzierung mit dem Rep_Test_Fw Primer bestätigt.

6.6 Erstellung des Plasmids pTRCas9PstI

Zur einfacheren Handhabung wurde ebenfalls eine Variante der leeren CRISPR-Cas9 Kasette auf pTRKH2 kloniert. Bei der Variante, bei der die CRISPR-Cas9 Kasette ohne *Spacer* auf den pTRKH2 kloniert werden sollte, wurde wie folgt vorgegangen: Als Erstes wurde das Plasmid pCas9 wie unter Abschnitt 6.5 aus einer ÜK isoliert. Anschließend wurde die leere CRISPR-Cas9 Kasette des Plasmids pCas9 mit der Q5® High-Fidelity-Polymerase amplifiziert. Das PCR Programm ist das gleiche wie für die Variante, bei der die *Spacer* bereits kloniert sind (s. Tabelle 11).

Der gesamte PCR-Ansatz wurde in einem präparativen Gel aufgetrennt und je drei PCR-Ansätze wurden auf ein präparatives Agarosegel gegeben und bei 100 V für 1 h elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden drei Agarosegel-Aufreinigungen mittels QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit durchgeführt und alle drei Ansätze nach Auflösung der Agarose auf eine Säule des Kits gegeben, um eine Aufkonzentrierung des Produktes zu erreichen. Es wurde abweichend von den Angaben des Herstellers nicht mit QC Puffer gewaschen, um eine höhere Konzentration des Eluats zu erreichen.

Anschließend wurden 29 µL des Eluats (1334 ng DNA) mit PstI und BglII wie unter Abschnitt III.1 beschrieben restringiert. Anschließend wurde der Restriktionsverdau mit dem Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit nach Herstellerangaben gereinigt, wobei mit 6 µL Elutionsvolumen eluiert wurde. In einer Ligation wurden 200 ng restringierter pTRKH2 und 304 ng PCR-Produkt des pCas9 mit 1 µL zusätzlichem ATP ligiert. Als Vergleich wurde eine 1:1 Ligation des restringierten Vektors pTRKH2 und 304 ng der CRISPR-Cas9 Kassette von p428.25A durchgeführt. Das Amplifikat wurde wie unter Abschnitt 6.5.3 beschrieben hergestellt.

Die Ligation wurde in *E. coli* DH5α elektroporiert und wie in Abschnitt 6.2.1 verfahren. Anschließend wurden die weißen Kolonien gepickt und eine Kolonie-PCR (s. III.3) mit den Primern InsertCas9_Fw und M13/pUC Reverse durchgeführt, da hierbei das Ergebnis schneller erzielt werden konnte als wenn das ganze *Insert* überprüft worden wäre. Das PCR Programm ist in Tabelle 14 zu sehen.

Das Ergebnis der PCR wurde elektrophoretisch mittels 1%igem Agarosegel bei 120 V für 40 min aufgetrennt. Anschließend wurde von zwei der Kolonien eine Plasmidisolierung mittels QIAprep Spin Miniprep Kit vorgenommen und von dem isolierten Vektor das *Insert* mit dem Primer pUCM13-52 Sanger-sequenziert. Da das Ergebnis der Sanger-Sequenzierung nicht eindeutig war, wurde eine PCR Reaktion des gesamten *Inserts* mit dem Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) vorgenommen. Das PCR Programm ist in Tabelle 16 zu sehen.

Tabelle 16: PCR Programm zum Nachweis der CRISPR-Cas9 Kassette auf pTRKH2 mit dem Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	0:10
30	Denaturierung	98	0:01
	Anlagerung	64	0:05
	Elongation	72	1:15
1	Finale Elongation	72	1:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 5209 bp (Primer: M13/pUC Forward, M13/pUC Reverse)			

Das Ergebnis wurde mittels 1%iger Agarosegel-Elektrophorese bei 100 V für 1 h aufgetrennt. Anschließend wurde, nach positiver Gelelektrophorese, von dem Plasmidisolat eine *Full-Plasmid*-Sequenzierung durch MicroSynth durchgeführt. Die erhaltenen Dateien der Sequenz wurden durch Verwendung der Software SnapGene® (GSL Biotech LLC, San Diego, Kalifornien, USA) überprüft.

6.7 Erstellung des Plasmids pTRCas9 aus pTRCas9PstI

Durch die *Full-Plasmid*-Sequenzierung wurde bestätigt, dass sich auf dem Plasmid neben dem gewünschten *Insert* noch ein Stück chromosomale DNA vom *E. coli* DH5 α befand. Dies befand sich hinter dem *Insert* und wurde durch zwei PstI-Schnittstellen flankiert. Dieses Stück wurde durch einen Restriktionsverdau wie folgt entfernt: Von dem Plasmid pTRCas9PstI wurde 1 μ g mit 100 Units PstI-HF® gemischt und wie unter Abschnitt III.1 beschrieben, inkubiert. Der gesamte Restriktionsansatz wurde per Agarose-Gelelektrophorese bei 100 V für 1 h präparativ aufgetrennt und dann mittels QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit nach Herstellerangaben gelgereinigt. Anschließend wurde eine Ligation des Restriktionsansatzes vorgenommen, in dem 161 ng des restringierten, gereinigten Vektors mit sich selbst für 16 h bei 16 °C ligiert wurde. Dann wurde erneut in *E. coli* DH5 α , wie unter Abschnitt 6.2 beschrieben, elektroporiert und auf BHI + Er150 Agarplatten der Elektroporationsansatz ausplattiert.

Anschließend wurde von einem Klon eine Plasmidisolation durchgeführt und die erhaltene Plasmid-Lösung sowie eine Plasmid-Lösung von pTRCas9PstI mit folgender PCR untersucht. Es wurde die *Taq* DNA-Polymerase mit dem PCR Programm aus Tabelle 17 verwendet.

Tabelle 17: PCR Programm zum Nachweis der gesamten CRISPR-Cas9 Kassette auf pTRKH2.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	52	1:00
	Elongation	68	5:50
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 5278 bp (Primer: pUCM13-rev-157, pUCM13-52)			

Mittels Gel-Elektrophorese (0,8%iges Agarosegel, 100 V, 1 h) wurde nachgewiesen, dass die *E. coli* DNA bei dem Klon ausgeschnitten wurde. Das Ergebnis wurde durch Sanger-Sequenzierung bestätigt. Dafür wurde das Amplifikat der PCR, wie in Abschnitt III.5 beschrieben, gereinigt und anschließend Sanger-sequenziert. Von der positiven Transformante wurde eine Plasmidisolierung mittels QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Ebenso

wurde ein Glycerol-Stock der positiven Transformante, wie in Abschnitt 6.1 beschrieben, hergestellt. Die Plasmidkarte wurde mit SnapGene® erstellt.

6.7.1 Klonierung der *Spacer* in das Plasmid pTRCas9

Um in das Plasmid pTRCas9 *Spacer* einzubringen, wurden die *Spacer* oppDBind2, codY3 und codYLR wie unter Abschnitt 6.4 beschrieben, hergestellt. Dann wurden die *Spacer* in einer 5:1 (*Insert*:Vektor) Ligation (500 ng pTRCas9) oder 7:1 (*Insert*:Vektor) Ligation (355 ng pTRCas9) ligiert und anschließend in *E. coli* DH5α 4,6 µL der Ligation elektroporiert. Anschließend wurde das Zellpellet durch Zentrifugation bei 6010 × *g* für 5 min abgetrennt, in 100 µL PBS resuspendiert und auf einer BHI + Er150 Agarplatte ausplattiert. Das Plasmid der Klon wurde daraufhin mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert und mit dem pCas9Sp_Rv Primer der Bereich des *Spacer* auf dem Vektor Sanger-sequenziert.

6.8 Hitzeschock Transformation in *E. coli* WM3064

Chemisch kompetente *E. coli* WM3064 Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 100 ng des Plasmids pTRKH2 oder pTRCas9.25A zu den Zellen gegeben und diese gemischt. Das Gemisch wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 Sekunden bei 42 °C inkubiert und anschließend für 2 min im Eisbad einem Kälteschock unterzogen. Zu den Zellen wurde 600 µL SOC-Medium gegeben und für 40 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf BHI + Er150 + DAP Agarplatten bei 37°C für 24 h inkubiert.

Jeweils drei Klone der pTRCas9.25A Transformation wurden mit Kolonie-PCR, nach Abschnitt III.3, und dem in Tabelle 15 dargestellten PCR Programm untersucht. Wiederum drei Klone der PTRKH2-Transformation wurden durch Kolonie-PCR (s. III.3) und mit dem PCR Programm in Tabelle 18 gescreent.

Tabelle 18: PCR Programm zum Nachweis der Transformation von pTRKH2.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	49	0:15
	Elongation	68	0:10
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 146 bp (Primer: M13/pUC Forward, M13/pUC Reverse)			

Das Ergebnis wurde gelelektrophoretisch mittels 2%igem Agarosegel bei 120 V und 40 min aufgetrennt. Es wurden Glycerol-Stocks der positiven Klone, wie unter Abschnitt 6.1 beschrieben, erstellt.

6.9 Konjugation von *E. coli* WM3064 und *L. cremoris* LTH7122

E. coli WM3064 pTRCas9.25A und *E. coli* WM3064 pTRKH2 wurden jeweils für 16 h in BHI-Boullion + Er150 + DAP bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. *L. cremoris* LTH 7122 wurde für 16 h in GM17-Boullion bei 30 °C statisch kultiviert. Aus beiden Kulturen wurde jeweils eine frische Kultur auf OD₆₀₀ 0,2 eingestellt. Anschließend wurde die *E. coli* WM3064 Kultur 3 h und die *L. cremoris* LTH 7122 Kultur 5 h unter den genannten Bedingungen inkubiert und anschließend ein Zellpellet, das der OD₆₀₀ 1,0 entspricht, durch Abzentrifugieren bei 2348 × *g* für 3 min gewonnen. Das Zellpellet wurde jeweils drei Mal mit frischer Boullion (für *E. coli* WM3064 BHI, für *L. cremoris* LTH 7122 GM17) gewaschen und bei 2348 × *g* für 3 min pelletiert. Anschließend wurden alle Kulturen abzentrifugiert (2348 × *g*, 5 min) und in 100 µL BHI-Boullion zunächst der *L. cremoris* LTH 7122 aufgenommen und mit den gleichen 100 µL *E. coli* WM3046 resuspendiert. Von den 100 µL wurden 65 µL als Tropfen auf eine BHI + DAP Agarplatte gegeben und bei 30 °C inkubiert. Nach 24 h und nach 48 h wurden Zellen von der Platte abgeschabt und in einer dezimalen Verdünnungsreihe verdünnt. Die Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻⁴ wurden auf GM17 + Er10 Agarplatten ausplattiert.

Zur Überprüfung der biologischen Masse der Konjugation wurde eine 16S-rRNA Kolonie-PCR vorgenommen. Dazu wurde etwas Zellmasse, wie in Abschnitt III.3 beschrieben, aufgeschlossen und folgendes PCR Programm verwendet (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: PCR Programm zum 16S-rRNA Nachweis.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	45	0:15
	Elongation	68	1:30
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: ca. 1500 bp (Primer: 616V, 630R)			

Die Konzentration des Amplifikats wurde photometrisch gemessen und anschließend eine Aufreinigung wie in Abschnitt III.5 beschrieben durchgeführt. Dann wurde das Amplifikat mit dem 616V Primer Sanger-sequenziert.

6.10 Erstellung des Plasmids pNZrecTLR

Zunächst wurde mit dem DNEasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) die chromosomale DNA von *E. faecalis* ATCC14506 isoliert. Dazu wurde laut Protokoll nach Herstellerangaben verfahren, außer dass vor der Zugabe der Proteinase K 4 µL RNase A (QIAGEN, Hilden, Deutschland) hinzugegeben und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Dann wurde weiter wie im Protokoll mit der Zugabe der Proteinase K aus dem Kit verfahren. Es wurde eine PCR entwickelt, die das komplette *recT*-Gen von *E. faecalis* ATCC14506 abdeckt. Das *recT*-Gen des Isolats der *E. faecalis* ATCC14506 DNA wurde per PCR mit der Q5® High-Fidelity-Polymerase und den Primern recT_RBS_Fw und RecT-Rv-XbaI nachgewiesen, damit aufgrund der Verwendung der High-Fidelity-Polymerase keine Fehlbasenpaarung vorliegt. Folgende PCR Bedingungen wurden angewandt (s. Tabelle 20):

Tabelle 20: PCR Programm zur Amplifikation des *recT*-Gens von *E. faecalis* ATCC14506.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	3:00
30	Denaturierung	98	0:10
	Anlagerung	64	0:30
	Elongation	72	0:30
1	Finale Elongation	72	2:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 1107 bp (Primer: recT_RBS_Fw, RecT-Rv-XbaI)			

Das Ergebnis wurde per Gelelektrophorese (1%iges Agarosegel, 120 V, 40 min) bestätigt. Anschließend wurde eine Reinigung des PCR-Produktes durchgeführt, wie in Abschnitt III.5 beschrieben.

Die Sanger-Sequenzierung des Amplifikats wurde mit beiden verwendeten Primern durchgeführt, damit die Primer zur Herstellung des Ligationsproduktes aufgrund der exakten DNA-Sequenz von *E. faecalis* ATCC14506 verwendet werden konnten.

Das Plasmid pNZ8048 wurde aus dem Stamm *L. cremoris* MG1363 mittels Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert, wie unter Abschnitt III.6 beschrieben. Anschließend wurde das Plasmid mit XbaI und PstI nach dem allgemeinen Verfahren restringiert (s. III.1). Das *recT*-Gen wurde von dem Stamm *E. faecalis* ATCC 14506 mit den Primern NrecT_PstI und RecT-Rv-XbaI und einmal mit den Primern RecT_Fw_Guo_long und RecT-Rv-XbaI mittels PCR amplifiziert. Da bei der Sequenzierung eine abweichende Sequenz zu der aus dem Paper von Guo et al. (2019) vorlag, wurde dieses Ergebnis durch Verwendung des Primers RecT_Fw_Guo_long überprüft, um sicherzustellen, dass es nicht aufgrund der Sanger-Sequenzierung zu Abweichungen in der Sequenz gekommen war. Somit wurden

beide *Forward*-Primer getestet. Es wurde eine PCR mit der Q5® High-Fidelity-Polymerase und folgendem PCR Programm (s. Tabelle 21) durchgeführt:

Tabelle 21: PCR Programm zur Amplifikation des *recT*-Gens von *E. faecalis* ATCC14506 mit Klonierungs-Primern.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	3:00
30	Denaturierung	98	0:10
	Anlagerung	70	0:30
	Elongation	72	0:30
1	Finale Elongation	72	2:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 1036 bp (Primer: RecT_Fw_Guo_long, RecT-Rv-XbaI); 992 bp (NrecT_PstI, RecT-Rv-XbaI)			

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch im 1%igen Agarosegel für 40 min bei 120 V aufgetrennt. Das PCR-Produkt des NrecT_PstI und des RecT-Rv-XbaI Primers wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 120 V für 40 min präparativ aufgetrennt und dann mittels QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit nach Herstellerangaben gelgereinigt und anschließend mit XbaI und PstI-HF® restringiert (s. III.1). Der Restriktionsverdau wurde mittels QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Anschließend wurde eine Ligation mit dem Vektor im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Die Transformation erfolgte in elektrokompente *L. cremoris* NZ9000 Zellen, die wie in Abschnitt 6.3 hergestellt wurden. Es erfolgte eine Plasmidisolierung für Gram-positive Bakterien mittels QIAprep Spin Miniprep Kit und dem unter Abschnitt III.6 angewendeten Verfahren. Außerdem wurde von der Transformante ein Glycerol-Stock, wie unter Abschnitt 6.1 beschrieben, hergestellt. Der Erhalt des pNZrecTLR wurde über eine *Full-Plasmid*-Sequenzierung bestätigt. Das Plasmid pNZrecTLR wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Plasmidkarte von pNZrecTLR wurde mit SnapGene® erstellt.

6.10.1 Erstellung des Plasmids pNZrecTPG aus pNZrecTLR mittels HiFi-Assembly

Da das Startcodon beim Vektor pNZ8048 an der NcoI-Schnittstelle liegt und diese Schnittstelle nicht verwendet werden konnte, befanden sich somit sechs Aminosäuren vor dem eigentlichen Startcodon des *recT*-Gens. Diese wurden mithilfe des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB, Frankfurt, Deutschland) entfernt.

Für das NEBuilder® HiFi DNA Assembly (HiFi-Assembly) wurden mithilfe des NEBcloner® (NEB, Frankfurt, Deutschland) Primer designt, um die DNA-Sequenz zwischen der NcoI-Schnittstelle und dem Startcodon zu entfernen. In einer PCR wurde das Rückgrat mit dem

Promotor und in einer weiteren PCR das *recT*-Gen amplifiziert. Für die erste PCR wurde pNZ8048 und eine Q5® High-Fidelity-Polymerase verwendet. Das PCR Programm zur Amplifikation des Rückgrats aus pNZ8048 wurde wie folgt gewählt (s. Tabelle 22):

Tabelle 22: PCR Programm zur Amplifikation des pNZ8048 Rückgrats für das HiFi-Assembly.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	2:00
30	Denaturierung	98	0:10
	Anlagerung	69,5	0:15
	Elongation	72	1:30
1	Finale Elongation	72	2:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 3339 bp (pNZ8048_fwd_Hifi_5AS, pNZ8048_rev_Hifi_5AS)			

Für die PCR zur Amplifikation des *recT*-Gens von pNZrecTLR wurde eine Q5® High-Fidelity-Polymerase und das Programm in Tabelle 23 gewählt. Aufgrund der langen Überhänge der Primer, die dem HiFi-Assembly zugrunde liegen, wurde eine PCR mit vier Zyklen mit einer Anlagerungs-Temperatur gewählt, die dem Teil des Primers, der an das *recT*-Gen hybridisiert, entspricht. Anschließend wurden 26 Zyklen durchgeführt, die der Anlagerungs-Temperatur der Gesamtlänge der Primer entsprechen.

Tabelle 23: PCR Programm zur Amplifikation des *recT*-Gens vom pNZrecTLR für das HiFi-Assembly.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	2:00
4	Denaturierung	98	0:10
	Anlagerung	60	0:20
	Elongation	72	0:30
26	Denaturierung	98	0:10
	Anlagerung	72	0:20
	Elongation	72	0:30
1	Finale Elongation	72	2:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 995 bp (Primer: recT_fwd_Hifi_5AS, recT_rev_Hifi_5AS)			

Das *recT*-PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit aufgereinigt und das pNZ8048-PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 120 V für 40 min präparativ aufgetrennt und dann mittels QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit gelgereinigt. Beides erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurde das HiFi-Assembly nach

Herstellerangaben verwendet. Die Transformation des HiFi-Assemblys erfolgte in elektrokompente *L. cremoris* NZ9000, die wie in Abschnitt 6.3 hergestellt wurden. Die Elektroporation wurde drei Mal wiederholt und von einer dezimalen Verdünnungsreihe die Verdünnungsstufen bis 10^{-3} auf GM17 + Cat5 Agarplatten ausplattiert und drei Tage bei 30 °C inkubiert. Von den positiven Klonen wurde eine Plasmidisolierung mittels QIAprep Spin Miniprep Kit und anschließend eine PCR mit der *Taq* DNA-Polymerase mit dem Programm in Tabelle 24 vorgenommen.

Tabelle 24: PCR Programm zur Amplifikation des *recT*-Gens auf pNZ8048 zur Bestätigung der Entfernung überschüssiger DNA-Sequenz durch das HiFi-Assembly.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	2:00
30	Denaturierung	95	0:15
	Anlagerung	45	0:30
	Elongation	68	0:30
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 494 bp (Primer: Insert_recT_Fw, Insert_recT_Rv)			

Das Ergebnis wurde mittels 1%igem Agarosegel bei 120 V und 40 min elektrophoretisch visualisiert. Das Entfernen der Basen der nach PCR positiven Klone wurde durch Sanger-Sequenzierung des isolierten Plasmids bestätigt. Das Plasmid pNZrecTPG wurde mittels QIAprep Spin Miniprep Kit aus *L. cremoris* NZ900 isoliert (s. III.6) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Ebenso wurde von der Transformante ein Glycerol-Stock, wie unter Abschnitt 6.1 beschrieben, hergestellt. Die Plasmidkarte von pNZrecTPG wurde mit SnapGene® erstellt.

6.11 Elektroporationsansätze in *Lactococcus* spp.

In elektrokompente Zellen *L. cremoris* NZ9000, die wie in Abschnitt 6.3 hergestellt wurden, wurden verschiedene Plasmide elektroporiert. Für die Elektroporation der Starterkulturstämme mit pNZ8048 wurden diese wie nach Abschnitt 6.3 hergestellt und elektroporiert. Die weiteren getesteten Bedingungen sind in Tabelle 25 zu sehen. Es wurden Plasmidisolierungen der einzelnen Plasmide durch das QIAprep Spin Miniprep Kit mit dem Protokoll für Gram-positive Bakterien (s. III.6) durchgeführt.

Tabelle 25: Wachstumsbedingungen der zugehörigen Plasmidtransformationen.

Plasmid	<i>L. cremoris</i> LTH 7122	<i>L. lactis</i> LTH 7123
pGK12	GMS17 + 1 % Glycin ÜK, GSM17 + 3,25 % Glycin ÜK	GSM17 + 1,25 % Glycin ÜK
pNZ9530	GMS17 + 1 % Glycin ÜK	GSM17 + 1 % Glycin ÜK
pMSP3535VA	GMS17 + 1 % Glycin ÜK	GMS17 + 1 % Glycin ÜK GSM17 + 1 % Glycin OD ₆₀₀ 0,9

Für die Elektroporationen wurden Plasmidmengen von 364 ng – 1000 ng verwendet. Die Elektroporationsansätze von pGK12 wurden auf GM17 + Cat5 Agarplatten ausplattiert. Die Elektroporationsansätze von pNZ9530 wurden auf GM17 + Er10 Agarplatten und die pMSP3535VA Ansätze auf GM17 + Kan100 Agarplatten ausplattiert. Alle Ansätze wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert und anschließend die gebildeten Kolonien, falls möglich, ausgezählt.

6.11.1 Nachweis des Plasmids pTRCas9 in *L. cremoris* NZ9000

Von der Plasmidisolierung des pTRCas9 wurden 100 ng Plasmid in elektrokompente Zellen von *L. cremoris* NZ9000 hergestellt und wie in Abschnitt 6.3 beschrieben elektroporiert. Von dem Elektroporationsansatz wurden 1:10 der inkubierten Zellen auf GM17 + Er10 Agarplatten ausplattiert und für drei Tage inkubiert. Die Lyse der Zellen zur Kolonie-PCR erfolgte wie unter Abschnitt III.3 beschrieben. Folgende PCR Ansätze wurden untersucht: Es wurde mit einem PCR Programm mittels Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix (s. Tabelle 16) die gesamte CRISPR-Cas9 Kasette untersucht. Des Weiteren wurde mittels spezifischer pCas9-Insert PCR mit der Taq DNA-Polymerase (s. Tabelle 14) sowie mittels Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix gescreent, um nachzuweisen, ob die Kolonie-PCR bei *L. cremoris* NZ9000 möglich ist. Das PCR Programm zum spezifischen pCas9-Insert Nachweis mittels Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix ist in Tabelle 26 zu sehen.

Tabelle 26: PCR Programm zum Nachweis des Cas9-Insert auf pTRKH2.

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98 0:10
30	Denaturierung	98 0:01
	Anlagerung	61 0:05
	Elongation	72 0:15
1	Finale Elongation	72 1:00
	Kühlphase	4 ∞
Amplifikat: 1123 bp (Primer: InsertCas9_Fw, M13/pUC Reverse)		

Das Ergebnis der verschiedenen PCRs wurde per Gelelektrophorese im 1%igem Agarosegel bei 120 V und 40 min analysiert.

6.11.2 Nachweis des Plasmids pNZ8048 in den Starterkulturstämmen

Als Nachweis, dass eine Kolonie-PCR von den Starterkulturen möglich ist, wurde jeweils eine Kolonie vom *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123, die mit 200 ng pNZ8048 elektroporiert worden sind, als Vorlage für eine Kolonie-PCR, wie in Abschnitt III.3 beschrieben, verwendet. Das PCR Programm ist in Tabelle 27 zu sehen.

Tabelle 27: PCR Programm zum Nachweis von pNZ8048.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	2:00
30	Denaturierung	95	0:20
	Anlagerung	45	0:45
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 598 bp (Primer: pNZ8048_Fw, pNZ8048_Rev)			

Das Ergebnis wurde gelelektrophoretisch bei 100 V und 1 h in einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt.

6.11.3 Nachweis des Plasmids pTRKH2 in *L. lactis* LTH 7123

Mittels Kolonie-PCR (s. III.3) wurde die Aufnahme des pTRKH2 in den *L. lactis* LTH 7123 untersucht. Das PCR Programm aus Tabelle 18 fand dazu Anwendung. Das Ergebnis wurde gelelektrophoretisch bei 150 V für 22 min in einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt.

6.12 Amplifikation des Xylose Promotors von *L. lactis* LTH 3882

Da *L. lactis* II1403 (*L. lactis* LTH 3882) laut Miyoshi et al. (2004) den Xylose Promotor tragen soll, wurde mit den Primern A51 und A52 versucht, ein Amplifikat zu erstellen. Dazu wurde zunächst die genomische DNA des *L. lactis* LTH 3882 mittels DNEasy Blood and Tissue Kit nach Herstellerangaben für Gram-positive Bakterien mit den Modifikationen, die bereits in Abschnitt 6.10 erwähnt wurden, isoliert. Die genomische DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Folgendes PCR Programm wurde mit dem Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix verwendet (s. Tabelle 28):

Tabelle 28: PCR Programm zur Amplifikation des Xylose Promotors von *L. lactis* LTH 3882 mittels Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	0:10
30	Denaturierung	98	0:01
	Anlagerung	63	0:10
	Elongation	72	0:10
1	Finale Elongation	72	1:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 553 bp (Primer: A51, A52)			

Das Ergebnis der PCR wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (1%ige Agarose, 120 V, 40 min). Anschließend wurde eine Reinigung des PCR-Produktes, wie unter Abschnitt III.5 beschrieben, durchgeführt. Das Amplifikat der PCR des Xylose Promotors von *L. lactis* LTH 3882 wurde dann Sanger-sequenziert.

6.12.1 Klonierung des Xylose Promotor auf das Plasmid pNZrecTLR zur Erstellung des Plasmids pNZrecTGV

Es wurde eine klassische Ligation zum Erstellen von pNZ8048 mit dem *recT*-Gen und dem Xylose Promotor verwendet. Zunächst wurde mit der Q5® High-Fidelity-Polymerase versucht, die Sequenz des Xylose Promotors mit Klonierungs-Primern zu generieren. Als Vorlage wurde isolierte genomische DNA von *L. lactis* LTH 3882 aus Abschnitt 6.12 verwendet. Es wurde folgendes PCR Programm mit der Q5® High-Fidelity-Polymerase mit den Klonierungs-Primern verwendet (s. Tabelle 29):

Tabelle 29: PCR Programm zur Amplifikation des Xylose Promotors mit Klonierungs-Primern und Q5® High-Fidelity-Polymerase.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	4:00
30	Denaturierung	98	0:10
	Anlagerung	67	0:30
	Elongation	72	0:10
1	Finale Elongation	72	2:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 185 bp (Primer: pXylt_RBS_Fw, pXylt_RBS_Rev)			

Bei Verwendung der Klonierungs-Primer mit der Q5® High-Fidelity-Polymerase war kein Amplifikat erkennbar und auch durch Optimierung (Verringerung der Anlagerungs-Temperatur auf 66 °C, Erhöhung der Elongationszeit auf 20 s, Erhöhung oder Erniedrigung der

eingesetzten DNA-Menge) der PCR nicht erzeugbar. Daher wurde entschieden, die PCR mit der *Taq* DNA-Polymerase durchzuführen, da das Amplifikat nur 185 bp lang war und so die relative Chance für Fehlbasenpaarungen als gering einzuschätzen war. Für die PCR des Xylose Promotors mit Klonierungs-Primern wurde folgendes PCR Programm mit *Taq* DNA-Polymerase verwendet (s. Tabelle 30).

Tabelle 30: PCR Programm zur Amplifikation des Xylose Promotors mit *Taq* DNA-Polymerase.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	49	0:30
	Elongation	68	0:30
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 185 bp (Primer: pXylt_RBS_Fw, pXylt_RBS_Rev)			

Das Ergebnis wurde per Gelelektrophorese (2%ige Agarose, 140 V, 30 min) bestätigt, gereinigt (s. Abschnitt III.5) und anschließend mit dem pXylt_RBS_Fw Primer sequenziert, um sicherzustellen, dass keine Fehlbasenpaarung stattgefunden hat. Das restliche PCR-Produkt wurde mittels QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit aufgereinigt und 1,5 µg PCR-Produkt mit jeweils 2 µL BglII und PstI, wie unter Abschnitt III.1 beschrieben, restringiert. Anschließend wurde der Restriktionsverdau mithilfe des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit aufgereinigt.

Als Rückgrat wurde pNZrecTLR verwendet, da hier nur der Nisin-Promotor gegen den Xylose Promotor ausgetauscht werden musste. Vom pNZrecTLR wurden 2 µg mit jeweils 2 µL BglII und PstI, wie unter Abschnitt III.1 beschrieben, restringiert. Der Restriktionsverdau wurde mit dem QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit aufgereinigt.

Für die Ligation wurden folgende Ansätze gewählt: 130 ng gereinigter und restringierter Vektor wurden mit einer 3:1 Ligation (*Insert*:Vektor), mit einer 7:1 (*Insert*:Vektor) Ligation und mit einer 10:1 (*Insert*:Vektor) Ligation mit dem Xylose Promotor Amplifikat ligiert. Die Ligationsansätze wurden anschließend in elektrokompente Zellen von *L. cremoris* NZ9000, beschrieben wie in Abschnitt 6.3, transformiert.

Für eine modifizierte Version der Kolonie-PCR wurden jeweils zehn Kolonien der Transformation drei Mal gepoolt und für 10 min bei 95 °C aufgeschlossen und anschließend folgendes PCR Programm (s. Tabelle 31) durchgeführt.

Tabelle 31: PCR Programm der Kolonie-PCR zum Screening des pNZrecTGV.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	48	0:30
	Elongation	68	1:30
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 1566 bp (Primer: pNZ8048_rev, Hifi_Test_Fw)			

Das Ergebnis wurde per 1%igem Agarosegel (120 V und 40 min) elektrophoretisch visualisiert. Anschließend wurde von neun Einzelkolonien des 7:1 (*Insert*:Vektor) Ligationsansatzes eine kürzere PCR zum Nachweis des Xylose Promotors mit der *Taq* DNA-Polymerase und dem PCR Programm in Tabelle 32 durchgeführt.

Tabelle 32: PCR Programm zum Nachweis des Xylose Promotors auf pNZrecTGV.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	2:00
30	Denaturierung	95	0:15
	Anlagerung	48	0:30
	Elongation	68	0:15
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 228 bp (Primer: Hifi_Test_Fw, Pxylt_RBS_rev)			

Das Ergebnis wurde per Gelelektrophorese (2%iges Gel, 140 V, 30 min) bestätigt und anschließend eine Plasmidisolierung mittels QIAprep Spin Miniprep Kit nach dem angepassten Verfahren (s. III.6) durchgeführt. Die erfolgreiche Klonierung des Xylose Promotors wurde durch Sanger-Sequenzierung des Plasmids untersucht. Die Plasmidlösung von pNZrecTGV wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Es wurde ein Glycerol-Stock der positiven Transformante, wie unter Abschnitt 6.1 beschrieben, erstellt. Die Plasmidkarte von pNZrecTGV wurde mit SnapGene® erstellt.

6.13 Elektroporation der Starterkulturstämme mit pNZrecTGV

Der Vektor pNZrecTGV wurde in die beiden Starterkulturstämme elektroporiert. Dafür wurde *L. cremoris* LTH 7122 in GSM17-Boullion + 3,25% Glycin als ÜK inkubiert und der *L. lactis* LTH 7123 in GSM17-Boullion + 1% Glycin als ÜK inkubiert. Nach der Elektroporation, wie unter Abschnitt 6.3 einzusehen, wurden beide Ansätze auf GM17 + Cat5 Agarplatten

ausplattiert. Es wurde jeweils auf eine Agarplatte der gesamte Elektroporationsansatz ausplattiert und für 48 h bei 30 °C bebrütet. Nachfolgend wurden 18 Kolonien von *L. cremoris* LTH 7122 und 17 Kolonien von *L. lactis* LTH 7123 per Kolonie-PCR (s. III.3) gescreent. Folgendes PCR Programm (s. Tabelle 33) wurde für die Kolonie-PCR zum Screening der Transformanten verwendet:

Tabelle 33: PCR Programm zum Nachweis von pNZrecTGV.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	2:00
30	Denaturierung	95	0:15
	Anlagerung	47	0:30
	Elongation	68	0:35
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 618 bp (Primer: Hifi_Test_pNZ8048_fw, Insert_recT_Rv)			

Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch im 1%igem Agarosegel (120 V, 40 min) aufgetrennt und visualisiert. Von jeweils einer positiven Transformante von *L. cremoris* LTH 7122 und des *L. lactis* LTH 7123 mit dem Plasmid pNZrecTGV wurde ein Glycerol-Stock, beschrieben wie in Abschnitt 6.1, angefertigt.

6.13.1 Elektroporation mit Reparatur-Template in Xylose induzierte Starterkulturen

Es wurden zunächst zwei verschiedene Wachstumsbedingungen getestet. Da die beiden verwendeten Stämme *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 pNZrecTGV trugen, wurde für die Versuche mittels Xylose-Induzierung immer ein Medium (Boullion und Agar) mit dem Zusatz von 5 µg/mL Chloramphenicol verwendet. Zunächst wurden Zellen der exponentiellen Phase untersucht: Dafür wurden die Zellen angelehnt an Miyoshi et al. (2004) und Santos et al. (2021) behandelt. Als Erstes wurden die Zellen über Nacht in GM17-Boullion bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit M17-Boullion gewaschen und dann 1:50 in frischer XM17-Boullion inokuliert oder in frischer XM17-Boullion auf OD₆₀₀ von 0,1 angesetzt. Die Zellen beider Ansätze wurden bis OD₆₀₀ 0,3-0,5 (exponentielle Phase) bei 30 °C inkubiert und anschließend für die Elektroporation, wie in Abschnitt 6.3 dargelegt, vorbereitet.

Anschließend wurden zu beiden Ansätzen von *L. cremoris* LTH 7122 und von *L. lactis* LTH 7123 10 µg einzelsträngiges Reparatur-Template RepS620_FW_Gly, RepS620_FW_Stop, RepS620_RV_Gly oder RepS620_RV_Stop gegeben. Doppelsträngige DNA wurde ebenfalls im *L. cremoris* LTH 7122 getestet, in dem das Glycin Reparatur-Template (dsGlycin) aus Abschnitt 6.5.4 verwendet wurde. Anschließend wurde die

Elektroporation, beschrieben wie in Abschnitt 6.3, durchgeführt. Die Zellen des jeweiligen gesamten Elektroporationsansatzes wurden auf eine GM17 + Cat5 Agarplatte ausplattiert und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Nachfolgend werden die Zellen dieser Transformation „Ansatz Z“ genannt.

Des Weiteren wurde die Option untersucht, bei der die Zellen bis in die stationäre Phase wachsen, da dies in den Studien von Miyoshi et al. (2004) und Santos et al. (2021) ebenfalls versucht wurde. Zunächst wurde eine ÜK in GM17-Boullion bei 30 °C erzeugt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit M17-Boullion gewaschen und anschließend 1:100 verdünnt in XM17-Boullion gegeben und über Nacht bei 30 °C inkubiert (stationäre Phase). Anschließend wurden aus den Starterkulturstämmen elektrokompetente Zellen gewonnen. Die weiteren Ansätze aus der stationären Phase sind in Tabelle 34 zu sehen. Abweichungen von der stationären Phase sind in der Tabelle notiert, falls diese untersucht wurden. Zellen der exponentiellen Phase wurden, wie oben beschrieben, hergestellt. Im Folgenden wurde untersucht, ob durch die Verwendung von 1 % Glycin die Mutationsrate erhöht werden kann. Daher wurde ebenfalls XSM17 + 1 % Glycin verwendet, dies wird mit „+ 1 % Gly“ in Tabelle 34 abgekürzt. Allen Ansätzen wurde, sofern nicht anders angegeben, 10 µg Reparaturtemplate bei der Elektroporation hinzugefügt. Die MAMA-PCR Programme der Tabelle 34 werden in Abschnitt 6.13.2 beschrieben.

Tabelle 34: Xylose-Ansätze der verwendeten Zellen und Programme der MAMA-PCR. Alle untersuchten Stämme tragen das Plasmid pNZrecTGV. Alle Ansätze wurden in XM17-Boullion inkubiert und befanden sich, wenn nicht anders beschrieben, in der stationären Phase des Wachstums ($OD_{600} = 1,5$). Exp. = Exponentiell. Gly = Glycin.

Stamm	Ansatz	PCR Programm
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 oder <i>L. lactis</i> LTH 7123 + RepS620_FW_Gly oder RepS620_FW_Stop oder RepS620_RV_Gly oder RepS620_RV_Stop oder dsGlycin	Z	MAMAvrs0, MAMAvrs1
<i>L. lactis</i> LTH 7123 + RepS620Ala	X	MAMAvrs1, MAMAvrs1.1
<i>L. lactis</i> LTH 7123 + RepS618Gly 1 x OD_{600} 1,8 1x OD_{600} 0,75 1x OD_{600} 0,43	Y	MAMAvrs4, MAMAvrs4.1, MAMAvrs4.2
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 + RepS620Stop	A1	MAMAvrs1.1, MAMAvrs1, MAMAvrs2, MAMAvrs3
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 + RepS620Stop + 1 % Gly	A2	MAMAvrs1.1
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 + RepS620Ala + 1 % Gly	B1	MAMAvrs3
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 + RepS620Ala	B2	MAMAvrs3
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 + RepS620GlyX + 1 % Gly	B3	MAMAvrs3
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 + RepS620GlyX + 1 % Gly, exp. Phase	C1	MAMAvrs3
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 + 100 µg RepS620GlyX + 1 % Gly, exp. Phase	C2	MAMAvrs3
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 + 100 µg RepS620GlyX + 1 % Gly	B4	MAMAvrs3

6.13.2 MAMA-PCR zum Nachweis der Mutationen S620Gly und S620Stop des *prtP*-Gens in Starterkulturen

Um eine mögliche Mutation des *prtP*-Gens nachzuweisen, wurde die MAMA-PCR verwendet. Zunächst wurden die Transformanten des Ansatzes Z untersucht. Alle im folgenden genannten MAMA-PCRs und PCRs zur Überprüfung der Mutation per Sequenzierung wurden wie Kolonie-PCRs (s. Abschnitt III.3) durchgeführt. Die Ergebnisse der MAMA-PCRs wurden gelelektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel bei 120 V und 30 min aufgetrennt und visualisiert. Alle Amplifikate, die durch PCR zur Überprüfung der Mutation erstellt wurden, wurden vor der Sanger-Sequenzierung, wie unter Abschnitt III.5 beschrieben, gereinigt und

anschließend sequenziert. Eine erste Untersuchung der Mutation des *prtP*-Gens des Ansatzes Z erfolgte mit dem PCR Programm MAMAvrs0 (s. Tabelle 35).

Tabelle 35: PCR Programm der MAMAvrs0 PCR.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
35	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	47	0:30
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	10:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 946 bp und 545 bp			
Primer: S620S-MAMAR + S620S-MAMAF1 + S620A-MAMAF2			

Zur Sequenzierung potenzieller Klone wurde die PCR ohne den Mutagenese-Primer als PCR zur Überprüfung der Mutation mit folgendem Programm (s. Tabelle 36) durchgeführt.

Tabelle 36: PCR Programm zur Überprüfung der Mutation für positive Klone der MAMAvrs0 PCR.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	47	0:30
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	10:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 946 bp (Primer: S620S-MAMAR, S620S-MAMAF1)			

Die Sanger-Sequenzierung des PCR-Amplifikats zur Überprüfung der Mutation der positiven Kolonien wurde mit dem Primer S620S-MAMAF1 durchgeführt. Daraufhin wurde eine PCR Optimierung vorgenommen, indem die Primer Konzentration des Mutagenese-Primers erhöht (von 0,2 µM auf 0,4 µM) und folgende PCR (s. Tabelle 37) angewendet wurde. Dieses Programm wurde MAMAvrs1 genannt.

Tabelle 37: PCR Programm der MAMAvrs1 PCR.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
35	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	47	0:30
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 946 bp und 545 bp			
Primer: S620S-MAMAR + S620S-MAMAF1 + S620A-MAMAF2			

Bei folgender Optimierung wurde die Cycle-Anzahl auf 30 gesenkt und nun MAMAvrs1.1 genannt. Das vollständige PCR Programm ist in Tabelle 38 zu sehen.

Tabelle 38: PCR Programm der MAMAvrs1.1 PCR. Die verschiedenen Primer Kombinationen in der letzten Zeile sind durch ein Komma voneinander getrennt.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	47	0:30
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 946 bp und 540 bzw. 545 bp			
Primer: S620S-MAMAR + S620S-MAMAF1 + S620A-MAMAF2, S620S-MAMAR + S620S-MAMAF11 + S620A-MAMAF2, S620S-MAMAR + S620S-MAMAF1 + S620A-MAMAF21, S620S-MAMAR + S620S-MAMAF11 + S620A-MAMAF21			

Bei MAMAvrs2 wurde die Anlagerungs-Temperatur auf 48 °C bei 35 Zyklen (s. Tabelle 39) erhöht. Die beiden Optimierungen der MAMAvrs2 PCR waren folgende: Bei den PCR Programmen MAMAvrs2.1 und MAMAvrs2.2 wurde die Anlagerungs-Temperatur auf 48 °C erhöht, aber die Zyklen-Anzahl variiert (30 Zyklen für MAMAvrs2.1 und 45 Zyklen für MAMAvrs2.2).

Tabelle 39: PCR Programm der MAMAvrs2 PCR. Die verschiedenen Primer Kombinationen in der letzten Zeile sind durch ein Komma voneinander getrennt.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
35	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	48	0:30
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 946 bp und 540 bzw. 545 bp			
Primer: S620S-MAMAR + S620S-MAMAF11 + S620A-MAMAF2, S620S-MAMAR + S620S-MAMAF1 + S620A-MAMAF21, S620S-MAMAR + S620S-MAMAF11 + S620A-MAMAF21			

Eine weitere Optimierung wurde durchgeführt, indem die Anlagerungs-Temperatur auf 46°C abgesenkt wurde. Dieses PCR Programm wurde MAMAvrs 3 genannt (s. Tabelle 40).

Tabelle 40: PCR Programm der MAMAvrs3 PCR. Die verschiedenen Primer Kombinationen in der letzten Zeile sind durch ein Komma voneinander getrennt.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
35	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	46	0:30
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 946 bp und 540 bzw. 545 bp			
Primer: S620S-MAMAR + S620S-MAMAF11 + S620A-MAMAF2, S620S-MAMAR + S620S-MAMAF11 + S620A-MAMAF21, S620S-MAMAR + S620S-MAMAF11 + S620G-MAMAF22			

Da die bereits verwendeten PCR Programme für den Mutationsnachweis in *L. cremoris* LTH 7122 optimiert wurden, wurde ein PCR Programm zum Mutationsnachweis in *L. lactis* LTH 7123 angewendet. Die Anlagerungs-Temperatur wurde auf den neuen Primer angepasst. Folgendes PCR Programm wurde für die Mutation von Serin an Position 618 im *L. lactis* LTH 7123 verwendet (s. Tabelle 41).

Tabelle 41: PCR Programm der MAMAvrs4 PCR.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
35	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	45	0:30
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 946 bp und 438 bp			
Primer: S620S-MAMAR + S618G-MAMAF3 + S620G-MAMAF1			

Durch Austausch des S620S-MAMAR Primer zum prtP_rev Primer wurde nach Optimierung das PCR Programm in Tabelle 42 verwendet.

Tabelle 42: PCR Programm der MAMAvrs4.1 PCR.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
35	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	45	0:30
	Elongation	68	1:45
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 1749 bp und 438 bp			
Primer: prtP_rev + S618G-MAMAF3 + S620G-MAMAF1			

Die Zyklen-Anzahl von MAMAvrs4 wurde auf 45 Zyklen erhöht und als neues PCR Programm in Tabelle 43 verwendet.

Tabelle 43: PCR Programm der MAAMvrs4.2 PCR.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
45	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	48	0:30
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 946 bp und 438 bp			
Primer: S620S-MAMAR + S618G-MAMAF3 + S620G-MAMAF11			

6.13.3 Transformation von Plasmid pTRKH2-Derivaten in Xylose induzierte Starterkulturstämme

Für den Versuch der Kombination von Xylose induzierten Zellen mit dem pTRCas9.25A Vektor und Zugabe der Reparatur-Templates RepS620Stop oder RepS620Ala wurde wie folgt vorgegangen: Die Starterkulturstämme, die den Vektor pNZrecTGV trugen, wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 in XM17-Boullion inkubiert und für die Elektroporation vorbereitet (s. Abschnitt 6.3). Die Elektroporationsansätze sind in Tabelle 44 zu sehen. Es wurden immer 150 ng des pTRCas9.25A Vektor zugegeben. Die gesamten Elektroporationsansätze wurden jeweils auf eine GM17 + Er10 Agarplatte ausplattiert und bei 30 °C für 72 h inkubiert.

Tabelle 44: Elektroporationsansätze zur Erstellung CRISPR-Cas9-basierter Mutationen des *prtP*-Gens in Starterkulturstämmen.

Stamm und Plasmid	Reparatur-Template + Vektor
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 pNZrecTGV	10 µg RepS620Stop + pTRCas9.25A
	100 µg RepS620Stop + pTRCas9.25A
	10 µg RepS620Ala + pTRCas9.25A
<i>L. lactis</i> LTH 7123 pNZrecTGV	10 µg RepS620Ala + pTRCas9.25A

Die Optionen in Tabelle 45 wurden ebenfalls getestet, um sicherzustellen, dass die Transformation von pTRCas9-Derivaten nicht aufgrund der hohen CRISPR-Cas9 Aktivität keine Transformanten zeigte. Es wurden die gleichen elektrokompenten Zellen wie aus dem Ansatz aus Tabelle 44 verwendet. Als Kontrolle wurden Zellen des *L. cremoris* Stammes NZ9000 verwendet, die nach dem Verfahren in Abschnitt 6.3 hergestellt wurden. Die gesamten Elektroporationsansätze wurden jeweils auf eine GM17 + Er10 Agarplatte ausplattiert und bei 30 °C für 72 h inkubiert.

Tabelle 45: Elektroporationsansätze Xylose induzierter Starterkulturen mit pTRCas9-Derivaten und pTRKH2.

Stamm und Plasmid	Ansatz
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 pNZrecTGV	825 ng pTRCas9.25A + 10 µg RepS620Ala
	1115 ng pTKRH2
	515 ng pTRCas9
<i>L. lactis</i> LTH 7123 pNZrecTGV	825 ng pTRCas9.25A + 10 µg RepS620Ala
	1115 ng pTKRH2
	515 ng pTRCas9
Kontrolle: <i>L. cremoris</i> NZ9000	825 ng pTRCas9.25A
	1115 ng pTKRH2
	515 ng pTRCas9

6.14 Transformation des Plasmids pTRCas9 mit *Spacern* in Nisin induzierte *L. cremoris* NZ9000 Zellen und Nachweis von Mutationen mittels PCR

Da die Autoren Guo et al. (2019) bei einer Reparatur-Template Menge von 10 µg genauso viele Transformanten wie bei 100 µg Menge erhielten, wurden 10 µg Reparatur-Template für die Elektroporation Nisin induzierter Zellen mit dem pTRCas9 mit *Spacern* verwendet. Die Elektroporation wurde wie unter Abschnitt 6.3 beschrieben durchgeführt.

Zunächst wurde *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTLR mit dem Plasmid pTRCas9oppDBind1 und mit dem Plasmid pTRCas9gal elektroporiert (s. Tabelle 46). Die elektrokompenten Zellen wurden, wie in Abschnitt 6.3.1. und Abschnitt 6.3.2 beschrieben, hergestellt und für die Elektroporation verwendet.

Anschließend wurde in *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTPG jeweils der Vektor pTRCas9oppDBind2, pTRCas9codY3 oder pTRCas9codYLR mit dem jeweiligen zugehörigen Reparatur-Template transformiert. Des Weiteren wurde in *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTPG jeweils der Vektor pTRCas9, pTRCas9oppDBind2, pTRCas9codY3 oder pTRCas9codYLR ohne Reparatur-Template elektroporiert. Die Nisin-Induktion der Ansätze pTRCas9, pTRCas9oppDBind2, pTRCas9codYLR und pTRCas9 erfolgte wie in Abschnitt 6.3.1 beschrieben. Für die Versuche mit pTRCas9codY3 wurde die Wachstumsphase der exponentiellen Phase sowie der stationären Phase, wie bei Transformation der Xylose induzierten Zellen, verglichen. Hierfür wurden die Zellen, wie in Abschnitt 6.3.1 beschrieben, bis auf folgende Ausnahme hergestellt: Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ 0,83 und bei einer OD₆₀₀ 1,75 geerntet und anschließend zur Elektroporation vorbereitet.

Die Ansätze sind in Tabelle 46 zu sehen. Bei pTRCas9, pTRCas9codY3, pTRCas9codYLR und pTRCas9oppDBind2 wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die Elektroporation erfolgte wie unter Abschnitt 6.3 beschrieben. Für die Elektroporationsansätze pTRCas9, pTRCas9codY3, pTRCas9codYLR und pTRCas9oppDBind2 wurde der gesamte Elektroporationsansatz je nach zu erwartender Keimzahl auf 1-4 GM17 + Er10 Agarplatten ausplattiert, um die Gesamtanzahl an Transformanten zu bestimmen.

6 Methoden

Tabelle 46: Elektroporationsversuche zur CRISPR-Cas9-basierten Mutation von *L. cremoris* NZ9000 mit verschiedenen Plasmiden und Reparatur-Templates. Ind. = induziert.

Plasmide und zugegebene Menge [ng]	Reparatur-Template
pNZrecTLR ind. + pTRCas9oppDBind1 280 ng	Reparatur_oppD
pNZrecTLR ind. + pTRCas9gal 100 ng	Galk0
pNZrecTPG ind. + pTRCas9 100 ng	-
pNZrecTPG ind. + pTRCas9oppDBind2 100 ng	Reparatur_oppD
pNZrecTPG ind. + pTRCas9codY3 100 ng	Repair_codY3
pNZrecTPG ind. + pTRCas9codYLR 100 ng	Reparatur_codY_LR

Die Agarplatten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Kolonie-PCR wie unter Abschnitt III.3 beschrieben. Für den Versuch mit dem Plasmid pTRCas9oppDBind1 wurde das MAMA-PCR Programm in Tabelle 47 verwendet. Für die PCR zur Überprüfung der Mutation für die Versuche mit pTRCas9oppDBind1 und pTRCas9oppDBind2 wurde das PCR Programm in Tabelle 48 verwendet.

Tabelle 47: PCR Programm der MAMA-PCR zum Nachweis CRISPR-Cas9-basierter Mutationen der *oppD* Bindestelle in *L. cremoris* NZ9000.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	46	0:40
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 1015 bp und 450 bp			
Primer: oppD_Bind_Fw + oppD_Bind_MAMAF + oppD_Rev			

Tabelle 48: PCR Programm zum Nachweis CRISPR-Cas9-basierter Mutationen der *oppD* Bindestelle in *L. cremoris* NZ9000.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:15
	Anlagerung	46	0:20
	Elongation	68	1:00
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 1015 bp (Primer: oppD_Bind_Fw, oppD_Rev)			

Für den Vektor pCas9gal wurde eine Kolonie-PCR mit dem PCR Programm in Tabelle 49 durchgeführt.

Tabelle 49: PCR Programm zum Nachweis CRISPR-Cas9-basierter Mutationen des *gal*-Gens in *L. cremoris* NZ9000.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
30	Denaturierung	95	0:15
	Anlagerung	35	0:10
	Elongation	68	0:40
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 706 bp (Primer: gal-tF, gal-tR)			

Die Ergebnisse der PCRs wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (1%iges Agarosegel, 120 V, 40 min) und zur Überprüfung der Mutationen eine Sanger-Sequenzierung der PCR-Amplifikate, die aus der PCR zur Überprüfung der Mutation erhalten wurden, durchgeführt. Hierfür wurde eine Reinigung der PCR-Amplifikate wie in Abschnitt III.5 beschrieben vorgenommen und anschließend das Amplifikat sequenziert.

Um die Mutation des *codY*-Gens durch das Reparatur-Template Reparatur_codY_LR oder das Reparatur-Template Repair_codY3 nachzuweisen, wurde eine Kolonie-PCR, wie unter Abschnitt III.3 beschrieben, verwendet. Folgendes PCR Programm wurde zum Screenen der Klone verwendet (s. Tabelle 50).

Tabelle 50: PCR Programm zum Nachweis CRISPR-Cas9-basierter Mutationen des *codY*-Gens in *L. cremoris* NZ9000.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	95	5:00
35	Denaturierung	95	0:30
	Anlagerung	46	0:30
	Elongation	68	0:20
1	Finale Elongation	68	5:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 391 bp (Primer: CodY_Fw, CodY_Rev)			

Das Ergebnis wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (2%iges Agarosegel, 120 V, 40 min). Das Amplifikat der Klone wurde aufgereinigt wie unter Abschnitt III.5 beschrieben und per Sanger-Sequenzierung auf die Mutation hin geprüft.

6.15 Proteinisolation und SDS-PAGE induzierter *L. cremoris* NZ9000 Zellen

Im Allgemeinen wurde die Proteinisolation der induzierten Zellen wie folgt vorgenommen: Zunächst wurden die Proben mit 100 µL NPI-10 resuspendiert. Dann wurde die Zellsuspension für jeweils 30 s in vier Intervallen Ultraschallimpulsen der Frequenz 24 kHz mit einem Zyklus von 0,5 und einer Amplitude von 70 % mittels UP200S (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Deutschland) ausgesetzt. Zwischen den vier Intervallen wurden die Proben jeweils für 30 s auf Eis gelagert. Nach dem Sonifizieren wurden die Proben bei 18410 x *g* und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 100 µL SDS-Ladepuffer versetzt sowie das Pellet mit 50 µL SDS-Ladepuffer versetzt. Beides wurde für 15 min bei 1000 rpm und 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.15.1 Xylose induzierte Zellen für SDS-PAGE

Die Xylose-Induzierbarkeit des *L. cremoris* Stammes NZ9000 wurde mittels SDS-PAGE untersucht, um zu erforschen, ob eine grundsätzliche Induzierbarkeit in milchassoziierten Stämmen nicht möglich ist. Miyoshi et al. (2004) untersuchten nur die Entstehung der Nuklease, die hinter einem Signal-Peptid kloniert wurde, per Western-Blot, sodass unklar war, ob dies ebenfalls für eine Rekombinase gilt, die nicht sekretiert werden soll. Daher wurde die Überexpression der Rekombinase nach einem Xylose Promotor mittels SDS-PAGE untersucht. Dafür wurde wie folgt vorgegangen: Die Zellen des *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTGV wurden wie in Kapitel 6.13.1 in XM17-Boullion angezogen. Als Vergleich wurden die Zellen einmal in GM17-Boullion und einmal in M17-Boullion ebenfalls inkubiert. Nach 8 h

wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei $6010 \times g$ geerntet und auf eine OD_{600} von 1,0 eingestellt. Anschließend wurden die Proteine aus den Zellen wie unter Abschnitt 6.15 beschrieben isoliert. Mit dem Proteinisolat wurde eine SDS-PAGE wie unter Abschnitt III.5 beschrieben durchgeführt.

5.15.2 Nisin induzierte Zellen für SDS-PAGE

Die Zellen wurden, wie unter Abschnitt 6.3.1. beschrieben, behandelt und anschließend nicht wie zur Elektroporation gewaschen, sondern auf OD_{600} 1,0 eingestellt und wie unter Abschnitt 6.15 beschrieben zur Proteinisolation mit anschließender SDS-PAGE vorbereitet. Die SDS-PAGE wurde wie unter Kapitel III.5 beschrieben vorgenommen.

Zur Überprüfung der Ergebnisse auf DNA-Ebene wurde eine PCR mit dem Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob durch Klonierung mittels HiFi-Assemblys das Stopcodon des *recT*-Gens versehentlich entfernt worden war. Das PCR Programm ist in Tabelle 51 zu sehen. Vergleichend wurde ebenfalls das Isolat des Plasmides pNZrecTLR untersucht.

Tabelle 51: PCR Programm zum Nachweis des *recT*-Gens auf pNZrecTLR und pNZrecTPG.

Zyklen		Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	0:10
30	Denaturierung	98	0:01
	Anlagerung	62	0:05
	Elongation	72	0:25
1	Finale Elongation	72	1:00
	Kühlphase	4	∞
Amplifikat: 1123 bp (Primer: Hifi_Test_Fw, pNZ8048_Rv)			

Das Amplifikat wurde mittels 1%igem Agarosegel bei 120 V für 40 min elektrophoretisch visualisiert. Anschließend wurde das Amplifikat wie in Abschnitt III.5 beschrieben aufgereinigt und anschließend eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt.

7 Ergebnisse und ergebnisbezogene Diskussion

Ziel der Arbeit war die Konstruktion verschiedener Plasmide und die Transformation dieser in die Starterkulturstämme *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123. Des Weiteren wurde die Xylose-Induzierung der Starterkulturstämme untersucht. Für *L. cremoris* NZ9000 wurde die Mutationsrate durch verschiedene *Spacer* sowie die Induzierbarkeit mit Nisin und Xylose durch Proteinisolation überprüft. Abschließend wurde das Wachstumsverhalten von Mutanten, die Mutationen der regulatorischen Bereiche des proteolytischen Systems trugen, analysiert.

7.1 Klonierung der *Spacer* 1D217 und 2D217 in das Plasmid pCas9

Die ausgezählten Kolonien der Verdünnungsreihe der Elektroporation in *E. coli* DH5α sind in Tabelle 52 dargestellt. Die Positiv-Kontrolle, die den isolierten Vektor enthält, generierte hierbei am meisten Klone, jedoch ist auffällig, dass die Gesamtzahl an Transformanten sehr gering war.

Tabelle 52: Transformanten der *Spacer* Klonierung auf pCas9 in *E. coli* DH5α.

Ligationsansatz	Transformanten pro Verdünnungsstufe [KbE]		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
pCas9 (isoliertes Plasmid)	10	0	0
5:1 1D217	3	0	0
5:1 2D217	5	0	0
7:1 1D217	2	0	0
7:1 2D217	2	0	0

Die Gelelektrophorese der Plasmidlösungen der Transformanten zeigte, dass alle getesteten Transformanten ein Plasmid der zu erwartenden Größe enthielten (s. Abbildung 31 im Anhang). Die Ergebnisse der Sequenzierung der *Spacer* 1D217 und 2D217 sind in Tabelle 84 im Anhang zu sehen. Das Resultat der Sequenzierung zeigte, dass die Klonierung der *Spacer* bei den Klonen 5:1 1D217, 5:1 2D217, 7:1 1D217, 7:1 2D217 erfolgreich war. Dies bestätigt, dass durch beide Ligationsverhältnisse die *Spacer* erfolgreich auf den Vektor pCas9 kloniert wurde. Daher wurden die restlichen *Spacer* anschließend nach dem gleichen Verfahren hergestellt. Die *Spacer* 3H281, 25A-S620 und OppDBind1 wurden auf dem Vektor pCas9 per Sequenzierung bestätigt (s. Tabelle 84 im Anhang). Somit wurde pCas9 mit den *Spacern* 1D217, 2D217, 3H281, 25A-S620 und OppDBind1 erfolgreich erstellt.

7.1.1 Klonierung der CRISPR-Cas9 Kasette mit *Spacern* in das Plasmid pTRKH2

Zur Klonierung der CRISPR-Cas9-Kasette mit *Spacern* in den Vektor pTRKH2 wurde mit den beiden Plasmidlösungen der *Spacer* 1D217 und 25A-S620 weitergearbeitet. In Tabelle 53 ist

die Anzahl der gezählten Kolonien der Transformanten zu sehen. Über ein Blau-Weiß-Screening wurden nur die weißen Kolonien gezählt und gescreent.

Tabelle 53: Transformanten der Ligation der CRISPR-Cas9 Kasette mit *Spacer*n mit dem pTRKH2 Rückgrat.

1. Ansatz Abbildung 6 A (A Klone)	Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
1:1 200ng 1D	2 weiße
2:1 200ng 1D	0 weiße
1:1 200ng 25A	3 weiße
1:1 50 ng 1D	0 weiße
2:1 50 ng 1D	0 weiße
2:1 50 ng 25A	0 weiße
3:1 50 ng 25A	0 weiße
2. Ansatz Abbildung 6 B (T Klone)	
1:1 200ng 25A	1 weißer
2:1 200ng 25A	4 weiße + 2 weiße
1:1 200ng pCas9 ohne <i>Spacer</i>	3 weiße
3:1 50ng 25A	0 weiße

Das Ergebnis der Gelelektrophorese der Kolonie-PCR des Screenings der Transformanten ist in Abbildung 6 zu sehen.

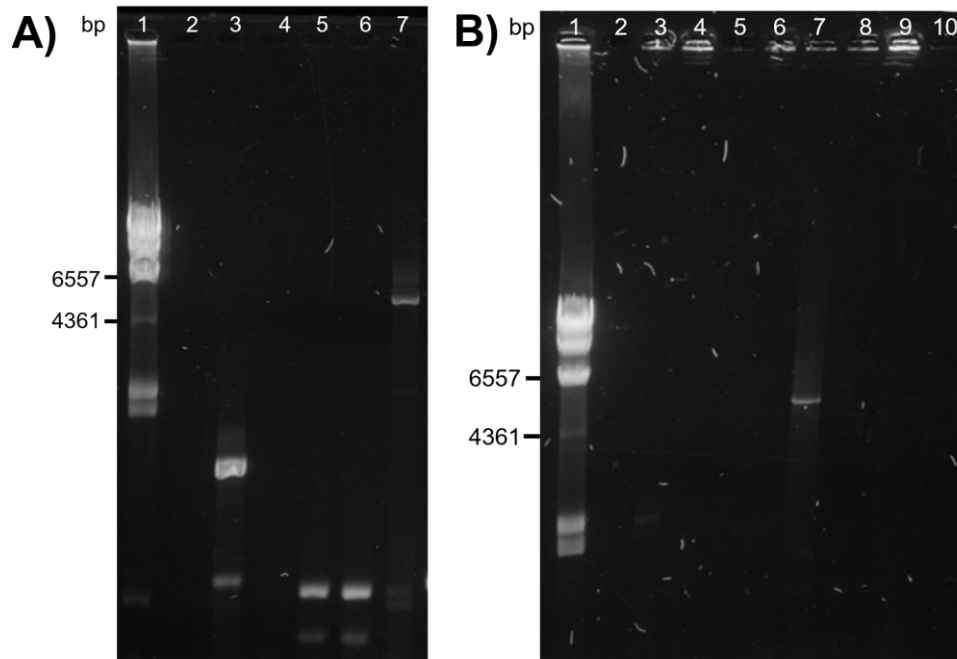


Abbildung 6: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR der Transformanten der Ligation von pCas9, p428.1D und p428.25A mit pTRKH2. **A)** Bahn 1: Lambda DNA/HindIII Marker DNA-Leiter, Bahn 2: Negativkontrolle ohne DNA (Englisch: *no template control*, NTC). Bahn 3: A1 (1:1 1D), Bahn 4: A2 (1:1 1D), Bahn 5: A3 (1:1 25A) Bahn 6: A4 (1:1 25A), Bahn 7: A5 (1:1 25A). **B)** Bahn 1: Lambda DNA/HindIII Marker DNA-Leiter, Bahn 2: NTC Bahn 3: T1 (1:1 25A) Bahn 4: T2 (2:1 25A), Bahn 5: T3 (2:1 25A), Bahn 6: T4 (2:1 25A), Bahn 7: T5 (2:1 25A), Bahn 8: T6 (pCas9), Bahn 9: T7 (pCas9), Bahn 10: T8 (pCas9).

Wie in Abbildung 6 zu sehen, zeigten nur zwei Transformanten das richtige *Insert*: Eine Kolonie (Bahn 7, Abbildung 6 A) des Ansatzes einer 1:1 Ligation mit 200 ng Plasmid und eine Kolonie (Bahn 7, Abbildung 6 B) einer 1:1 Ligation mit 200 ng Plasmid. Die zwei weiteren weißen Kolonien des Ligationsansatzes 1:2 200 ng Vektor waren erst zu einem späteren Zeitpunkt auf der Agarplatte sichtbar und sind deshalb nicht in dem gezeigten Agarosegel-Bild zu sehen. Sie werden deshalb in der Tabelle 53 als „+2 weiße“ gelistet, jedoch erfolgte noch ein Screening mit Kolonie-PCR. Alle anderen gescreenten Kolonien aus den getesteten Ligationsansätzen waren negativ. Die Sanger-Sequenzierung der Plasmide, je einer positive Kolonie pro Ansatz, mit den Primern pUMC13-52 und pUMC13-rev-157, um beide Enden des *Inserts* zu amplifizieren, zeigte, dass die Klonierung erfolgreich war (s. Tabelle 85 im Anhang). Somit wurde das Plasmid pTRCas9.25A erfolgreich hergestellt. Die Sequenz der *Full-Plasmid*-Sequenzierung von pTRCas9.25A ist in Tabelle 108 im Anhang zu sehen.

Das Ergebnis der Gelelektrophorese der Transformanten des Plasmids pTRCas9oppDBind1 zeigte, dass drei positive Transformanten für den pTRCas9oppDBind1 vorlagen (s. Abbildung 32 im Anhang). Die Plasmidlösung einer positiven Transformante wurde für weitere Versuche mit pTRCas9oppDBind1 verwendet.

7.2 Erstellung der Plasmide pTRCas9PstI und pTRCas9

In Tabelle 54 ist die Anzahl der gezählten Kolonien der Transformanten zu sehen. Da ein Blau-Weiß-Screening durchgeführt wurde, wurden nur die weißen Kolonien gezählt und gescreent.

Für die Reinigung des *Inserts* vor der Ligation wurde das QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit und das Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit verwendet. Die Kits wurden verglichen, da beim Monarch® Kit mit wesentlich weniger Volumen eluiert wurde und somit eine Aufkonzentrierung des Amplifikats möglich war.

Tabelle 54: Transformanten der pTRCas9PstI Herstellung. In Klammern die Bezeichnung der Klone in der Abbildung des Agarosegels der hier aufgeführten Ligationsansätze.

Ligationsansatz	Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
1:1 p428.25A (25A-Klone)	4 weiße
1:1 pCas9 ohne <i>Spacer</i> Agarosegel-gereinigt (gelgereinigter Klon)	1 weißer
2:1 pCas9 ohne <i>Spacer</i> Monarch® Kit (B-Klone)	3 weiße

Die weißen Kolonien der Ansätze, wie in Tabelle 54 dargestellt, wurden auf das korrekte *Insert* hin gescreent. Das Ergebnis der Gelelektrophorese der Kolonie-PCR ist in Abbildung 7 zu sehen.

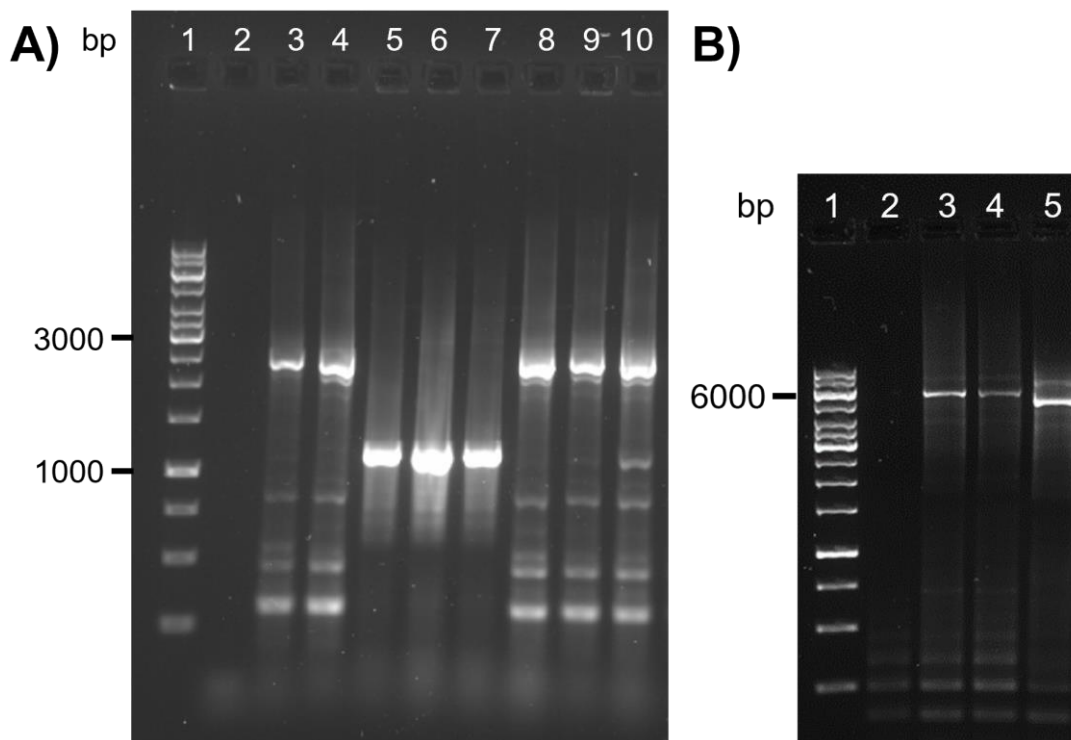


Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese der Cas9-Insert PCR. **A)** Cas9-Insert PCR auf pTRKH2; Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3: 25A 1. Klon, Bahn 4: 25A 2. Klon, Bahn 5: B9 (Monarch 1. Klon), Bahn 6: B10 (Monarch 2. Klon), Bahn 7: B19 (Monarch 3. Klon), Bahn 8: 25A 3. Klon, Bahn 9: gelgereinig 1. Klon, Bahn 10: 25.A 4. Klon. **B)** PCR gesamtes *Insert* Cas9 auf pTRKH2; Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3: B9, Bahn 4: B10 Bahn 5: pTRCas9.25A.

In Abbildung 7 A) ist das Ergebnis der Elektrophorese der Kolonie-PCR zu sehen. Die Proben auf Bahn 3,4,8,9 und 10 enthielten Fehlamplikate, da eine starke Bande bei ca. 2500 bp zu sehen war. Die Proben auf Bahn 5,6 und 7 enthielten das zu erwartende Amplifikat, da eine

Bande bei 1200 bp zu sehen war. Die Sequenzierung des Plasmidabschnittes mit dem Primer pUCM13-52 der Plasmidlösungen von Kolonie B9 und B10 war nicht eindeutig (s. Tabelle 86 im Anhang). Daher wurde das *Insert* über PCR-Amplifikation überprüft.

In Abbildung 7 B) ist das Ergebnis der PCR-Amplifikation des *Inserts* mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (Phusion™ Polymerase) und Gelelektrophorese dargestellt. Auffällig hierbei ist, dass die beiden Proben B9 und B10 leicht größere Banden erzeugten (Bahn 3 und 4, Abbildung 7 B) als die Positivkontrolle (Bahn 5, Abbildung 7 B). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die CRISPR-Cas9 Kasette erfolgreich in den Vektor kloniert wurde, aber ebenso ein weiteres Stück DNA kloniert wurde. Die *Full-Plasmid*-Sequenzierung des Plasmidisolats einer der Kolonien bestätigte, dass es sich um den Vektor pTRCas9PstI handelte (s. Tabelle 107 im Anhang). Durch Abgleich der Sequenz hinter der CRISPR-Cas9 Kasette über das *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al., 1990) mit der NCBI-Datenbank (Sayers et al., 2025) konnte festgestellt werden, dass in die PstI-Schnittstelle des Vektors genomische DNA (gDNA) von *E. coli* integriert wurde.

Das Ergebnis der Restriktion des pTRCas9PstI mit PstI und erneuter Ligation nach Aufreinigung zeigte, dass das integrierte Stück *E. coli* DNA entfernt werden konnte. Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist in Abbildung 8 zu sehen.

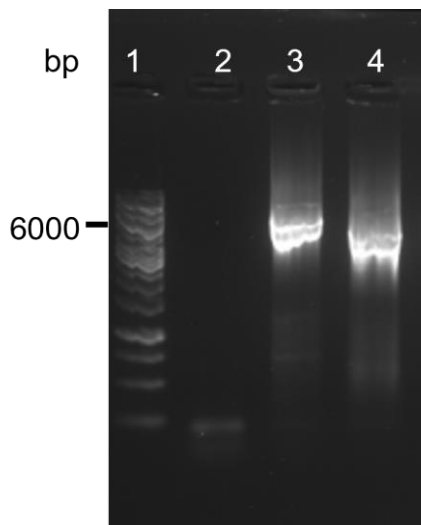


Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese der PCR, um das gesamte *Insert* auf pTRCas9 nach Restriktion nachzuweisen. Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3: pTRCas9PstI, Bahn 4: pTRCas9 (entspricht pTRCas9PstI nach Restriktion mit PstI).

Anschließend wurde dieses Ergebnis erneut durch Sanger-Sequenzierung bestätigt (s. Tabelle 87 im Anhang). Das finale Plasmid wurde pTRCas9 genannt. Die Plasmidkarte des Vektors pTRCas9 ist im Anhang in Abbildung 27 zu sehen.

Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des pTRCas9 Vektors mit den *Spacern* oppDBind2, codY3 und codYLR sowie eine *Full-Plasmid*-Sequenzierung des Plasmids pTRCas9codYLR sind im Anhang (s. Tabelle 88 und Tabelle 109) zu sehen.

7.2.1 Erstellung der Plasmide pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop

Die ausgezählten Kolonien der Ligation von pTRCas9.25A mit Glycin-Reparatur-Template und Stopcodon-Reparatur-Template sind in Tabelle 55 zu sehen.

Tabelle 55: Transformanten der Ligation des pTRCas9.25A mit den Reparatur-Templates Stop und Gly.

Ligation	Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
Positiv Kontrolle (pTRCas9.25A Isolat)	70
pTRCas9.25AStop	10 (A), 64 (B)
pTRCas9.25AGly	30 (C), 73 (D)

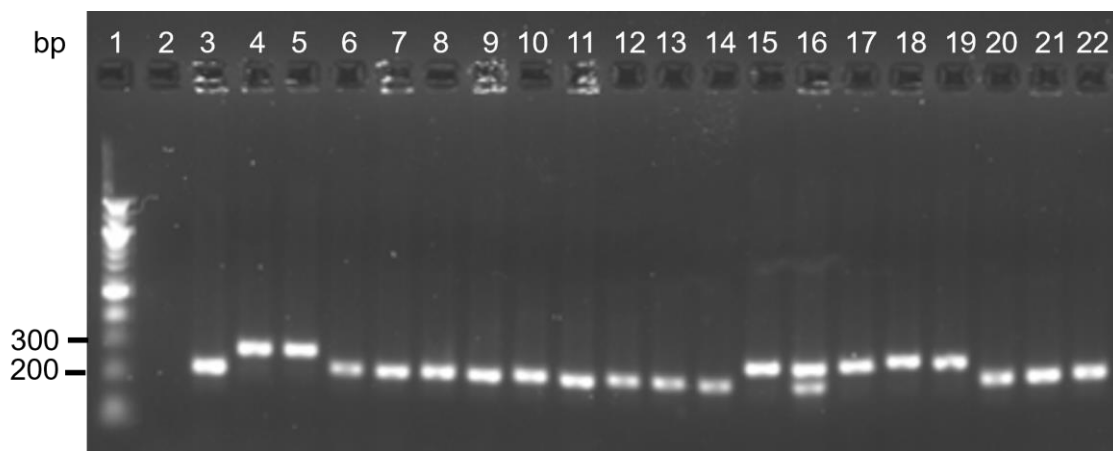


Abbildung 9: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zum Nachweis von pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3-7: Kolonie A1-A5, Bahn 8-12: Kolonie B1-B5, Bahn 13-17: Kolonie C1-C5, Bahn 18-22: Kolonie D1-D5.

Wie in Abbildung 9 zu sehen, zeigten von beiden Ligationsansätzen insgesamt 13 Kolonien eine einzelne, leicht kleinere Bande als die weiteren gescreenten Kolonien (Bahn 3, Bahn 6-14, Bahn 20-22). Dies deutete auf ein positives Ergebnis bezüglich der erfolgreichen Klonierung des Reparatur-Templates hin, da nach der erfolgreichen Klonierung das Amplifikat 223 bp statt 283 bp groß sein sollte.

Von den jeweils zehn gescreenten Kolonien pro Ansatz waren nach Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese fünf Kolonien pTRCas9.25AGly und acht Kolonien pTRCas9.25AStop positiv. Die Sequenzierung der Plasmide mit dem Primer Rep_Test_Fw von jeweils einem Klon bestätigte den Erhalt des Reparatur-Templates auf dem Vektor (s. Tabelle 89 im Anhang). Somit wurden die beiden Vektoren pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop erfolgreich hergestellt. In Tabelle 56 sind die Ergebnisse zur Erstellung der pTRCas9 Plasmide gegenübergestellt.

Tabelle 56: Übersicht zur Anzahl der positiven Transformanten zur Erstellung der pTRCas9 Vektoren.

Plasmid	Anzahl positiver Klone	Ligation
pTRCas9.25A	Drei insgesamt positiv: A5.25A, T5 und T9 aus gleichem Ansatz, A5.25A und T9 sequenziert	1:1 200 ng und 1:2 200 ng mit Amplifikat von pTRCas9.25A
pTRCas9PstI mit leerer CRISPR-Cas9 Kassette aber <i>E. coli</i> gDNA	3 positiv (B9, B10, B19) davon 2 sequenziert B9 und B10	1:2 200 ng mit pCas9 ohne Spacer und Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit
pTRCas9.25AGly	5 von 10 gescreent, einen sequenziert	5:1 Ligation mit 231 ng pTRCas9.25A
pTRCas9.25AStop	8 von 10 gescreent, einen sequenziert	5:1 Ligation mit 231 ng pTRCas9.25A

7.3 Elektroporation von *L. cremoris* NZ9000 mit dem Plasmid pTRCas9 und Nachweis des Plasmids

Es wurde überprüft, ob der Vektor pTRCas9 sich in den *L. cremoris* Stamm NZ9000 transformieren lässt. Aus dem Ansatz wurden 102 Transformanten erhalten. Die Kolonie-PCR mittels Phusion™ über das gesamte *Insert* lieferte kein positives Ergebnis (alle Bahnen im Agarose-Gel leer). Keiner der getesteten Klone war, trotz Wachstum auf der Antibiotika-supplementierten Agarplatte, positiv. Es ist davon auszugehen, dass der Plasmidnachweis aus *L. cremoris* NZ9000 über Kolonie-PCR nicht immer eindeutige Ergebnisse produzierte. Somit wurde als kürzeres PCR Programm die Cas9-*Insert* PCR durchgeführt, um zu prüfen, ob sich die Transformation des Plasmids in *L. cremoris* NZ9000 darüber nachweisen lässt. Vergleichend wurde pTRCas9 erneut in *E. coli* DH5α untersucht. Es wurde das Amplifikat der Phusion™ über das gesamte *Insert* des pTRCas9 aus *E. coli* DH5α und *L. cremoris* NZ9000 untersucht. Ebenso wurde nur ein Teil des *Inserts* durch die Cas9-*Insert* PCR analysiert. Die Cas9-*Insert* PCR wurde ebenfalls mit der Phusion™ und der Taq DNA-Polymerase auf *E. coli* DH5α und *L. cremoris* NZ9000 angewendet. Für die PCR-Ansätze wurde vom jeweiligen Stamm dasselbe Lysat einer Kolonie verwendet, um die verschiedene PCR-Ansätze besser vergleichen zu können. Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese ist in Abbildung 10 dargestellt.

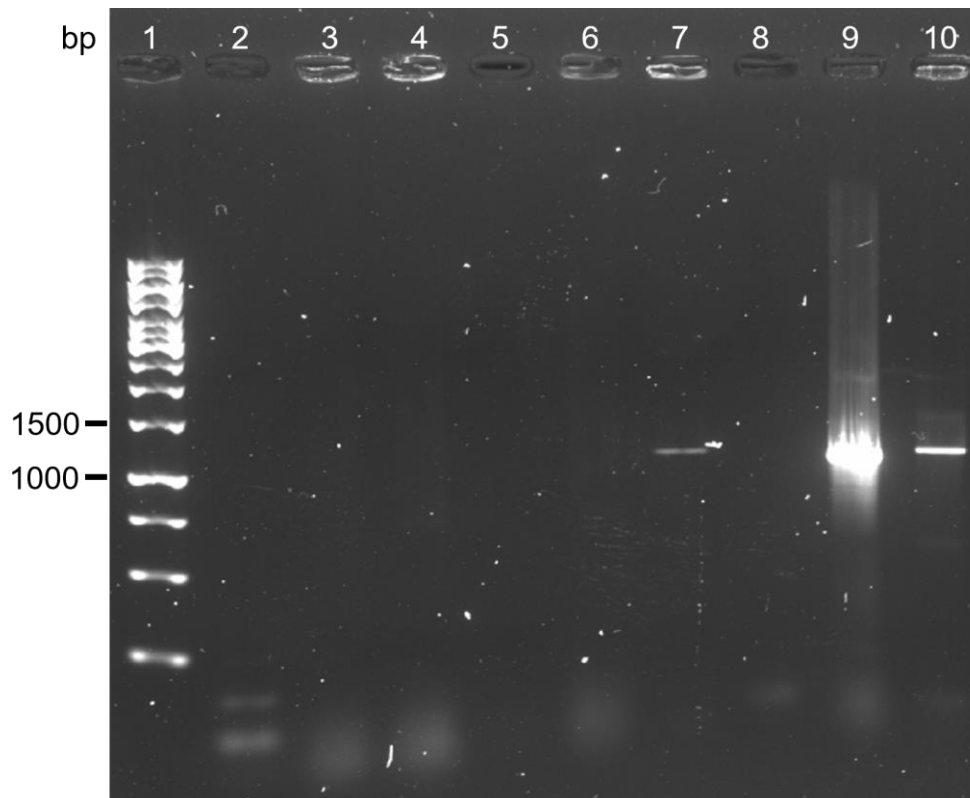


Abbildung 10: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR von *L. cremoris* NZ9000 pTRCas9 und *E. coli* DH5α pTRCas9 mit Phusion™ und Taq DNA-Polymerase (Taq). Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC Phusion™ M13 Primer, Bahn 3: *E. coli* Phusion™ M13 Primer, Bahn 4: *L. cremoris* NZ9000 Phusion™ M13 Primer, Bahn 5: NTC Phusion™ Insert, Bahn 6: *E. coli* Phusion™ Insert, Bahn 7: *L. cremoris* NZ9000 Phusion™ Insert, Bahn 8: NTC Taq Insert, Bahn 9: *E. coli* Taq Insert, Bahn 10: *L. cremoris* NZ9000 Taq Insert.

Die Phusion™ Kolonie-PCR der gesamten CRISPR-Cas9 Kasette zeigte weder bei *E. coli* DH5α noch bei *L. cremoris* NZ9000 eine Bande. Die Cas9-Insert PCR der Phusion™ zeigte bei dem Klon von *L. cremoris* NZ9000 eine leichte Bande. Nur die Cas9-Insert PCR der Taq DNA-Polymerase erzeugte bei beiden Klonen eine eindeutige Bande. Das Ergebnis zeigte, dass die Phusion™ nicht optimal für die Kolonie-PCR geeignet ist. Interessanterweise konnte die Phusion™ in *L. cremoris* NZ9000 das Insert nachweisen und in *E. coli* DH5α nicht, obwohl *L. cremoris* NZ9000 als Gram-positives Bakterium als schwieriger zu lysieren gilt. Somit wurde gezeigt, dass *L. cremoris* NZ9000 unter den angewendeten Elektroporationsbedingungen das Plasmid pTRCas9 aufnehmen kann.

7.4 Erstellung des Plasmids pNZrecTLR

Die Inhalte dieses Kapitels werden in Anlehnung an die Masterarbeit „Construction and Validation of a Recombinant Plasmid for Lactococcus lactis Genetic Engineering“ (Rumask, 2024) dargestellt und sollen im Folgenden zum besseren Verständnis des inhaltlichen Zusammenhangs beitragen.

Das Ergebnis der Sequenzierung des *recT*-Gens nach Amplifikation mit der Q5® High-Fidelity-Polymerase ist im Anhang in Tabelle 91 zu sehen. Es ist zu beobachten, dass die Sequenz der Primer, die in der Literatur (Guo et al., 2019) vorliegt, nicht deckungsgleich mit der Sequenz

war, die im Rahmen der Untersuchungen erhalten wurde. Dennoch wurde die erhaltene Sequenz erneut mit überprüft, da es sich auch um einen Fehler bei der durchgeführten Sanger-Sequenzierung handeln konnte. Daher wurden die Primer *recT_Fw_Guo_long* (mit der in der Literatur erhaltenen Sequenz) und der Primer *NrecT_PstI* (mit der sequenzierten Sequenz) für die Ligation des *recT*-Gens in pNZ8048 erstellt. Die Gelelektrophorese der Amplifikation des *recT*-Gens mit den Primern für die Ligation ist in Abbildung 11 zu sehen.

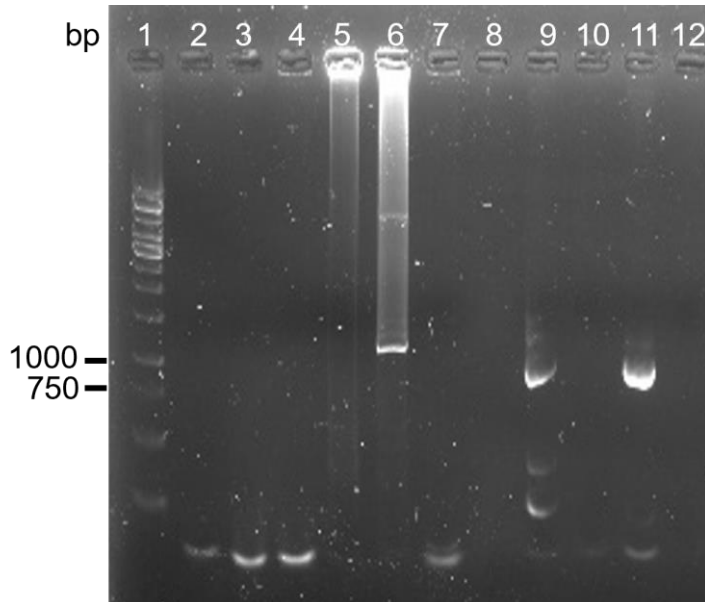


Abbildung 11: Agarose-Gelelektrophorese zur Amplifikation des *recT*-Gens. PCR des *recT*-Gens von *E. faecalis* ATCC14056 mit verschiedenen *Forward* Primern. Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2-8: Fremd-Proben Bahn 9: *recT*-PCR mit *recT-Fw-Guo-long*, Bahn 10: NTC *recT*-PCR mit *recT-Fw-Guo-long*, Bahn 11: *recT*-PCR mit *NrecT_PstI*, Bahn 12: NTC *recT*-PCR mit *NrecT_PstI*.

Wie in der gelelektrophoretischen Auswertung zu sehen ist, konnte mit beiden Primer-Paaren das gewünschte Amplifikat erzeugt werden (Bahn 9 für *recT-Fw-Guo-long* und Bahn 11 für *NrecT_PstI* in Abbildung 11). Dass dennoch ein Amplifikat durch den *recT-Fw-Guo-long* Primer erzeugt wurde, obwohl die Primer-Sequenz vermutlich nicht deckungsgleich mit der Vorlage ist, liegt wahrscheinlich an der Länge des Primers. Dieser hybridisierte vermutlich trotz vier Fehlbasenpaarungen an die Vorlage. Jedoch waren bei der Amplifikation mit *recT-Fw-Guo-long* viele weitere Fehlamplikate zu sehen. Daher wurde sich für die Herstellung des Ligationsproduktes für den Primer *NrecT_PstI* entschieden. Es wurde weiterhin eine Gelaufreinigung durchgeführt, da auch bei dieser Amplifikation ein leichtes Fehlamplikat bei 150 bp festzustellen war (s. Abbildung 11). Die Ergebnisse der Ligation sind in Tabelle 57 zu sehen.

Tabelle 57: Transformanten von *L. cremoris* NZ9000 der Ligation des pNZ8048 mit dem *recT*-Gen. Uv. = unverdünnt.

	Transformanten pro Verdünnungsstufe [KbE]		
Ansatz	Uv.	10 ⁻¹	10 ⁻²
1:1 Ligation	8	2	0

Das Gel der Agarosegel-Elektrophorese der Plasmidisolationen der Transformanten aus Tabelle 57 ist in Abbildung 12 dargestellt.

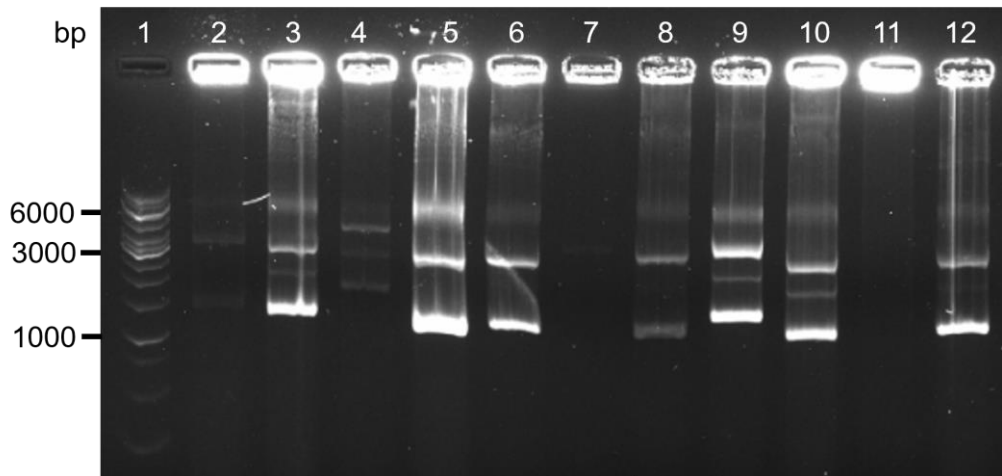


Abbildung 12: Agarose-Gelelektrophorese der Plasmidlösungen der Transformanten von *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTLR. GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2- 11: Plasmidisolat von den 10 Transformanten, Bahn 12: pNZ8048 Isolat aus *L. cremoris* NZ9000.

Die Plasmidlösung der Kolonien erbrachte für eine Kolonie (Bahn 4, s. Abbildung 12) leicht andere Plasmidbanden als für die anderen Plasmidlösungen. Es konnte hier von dem rekombinanten Plasmid ausgegangen werden, da die Banden oberhalb der Vergleichsprobe lagen. Die *Full-Plasmid*-Sequenzierung dieses Isolats bestätigte den Erhalt von pNZrecTLR (s. Tabelle 110 im Anhang). Die Plasmidkarte von pNZrecTLR ist im Anhang in Abbildung 28 zu sehen.

7.5 Erstellung des Plasmids pNZrecTPG aus pNZrecTLR

Die Ergebnisse der Transformation des HiFi-Assemblys in *L. cremoris* NZ9000 sind in Tabelle 58 zu sehen.

Tabelle 58: Transformanten von *L. cremoris* NZ9000 des HiFi-Assemblys zur Herstellung des pNZrecTPG.

	Transformanten pro Verdünnungsstufe [KbE]			
Ansatz	Uv.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
A1	90	0	0	0
A2	0	0	0	0
A3	17	0	0	0

Von sechs Transformanten wurden Plasmidlösungen gewonnen und mit den erhaltenen Plasmiden eine PCR durchgeführt, um das *Insert* nachzuweisen. Nach Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese waren alle getesteten Klone positiv (s. Abbildung 33 im Anhang), sodass von jedem Amplifikat eine Sanger-Sequenzierung mit dem Insert_RecT_Rv Primer durchgeführt wurde. Von den sechs gescreenten Klonen waren alle positiv, sodass die überschüssige DNA-Sequenz erfolgreich entfernt wurde (s. Tabelle 92 im Anhang). Der Vektor

pNZrecTPG wurde erfolgreich hergestellt. Die Plasmidkarte von pNZrecTPG ist im Anhang in Abbildung 29 zu sehen.

7.6 Erstellung des Plasmids pNZrecTGV

Mit der Phusion™ Polymerase und den A51/52 Primern entstand das Amplifikat der gewünschten Größe (s. Abbildung 34 im Anhang), sodass davon ausgegangen werden konnte, dass *L. lactis* LTH 3882 diesen DNA-Abschnitt trug. Anschließend wurde das Amplifikat des *L. lactis* Stammes LTH 3882 sequenziert und durch Abgleich mit der Referenzsequenz auf NCBI (Zugangsnummer: GCF_000006865) (Sayers et al., 2025) wurde bestätigt, dass der Xylose Promotor vorhanden ist (s. Tabelle 90 im Anhang). Daher wurde die Sequenz von *L. lactis* LTH 3882 zur Klonierung verwendet.

Für die Klonierung wurde nur der Bereich des Promotors durch Klonierungsprimer mittels PCR der gDNA amplifiziert. Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese des Xylose Promotors mit den Klonierungsprimern und der *Taq* DNA-Polymerase ist im Anhang in Abbildung 35 zu sehen. Die Sequenzierung des Amplifikats ist im Anhang unter Tabelle 93 zu sehen. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, dass keine Fehlbasenpaarung erzeugt wurde und diese Sequenz der zuvor amplifizierten Sequenz mit der Phusion™ Polymerase entsprach. Anschließend wurde das Amplifikat der *Taq* DNA-Polymerase für die Klonierung verwendet. Die Ergebnisse der Klonierung des Xylose Promotors in pNZrecTLR sind in Tabelle 59 zu sehen.

Tabelle 59: Transformanten von *L. cremoris* NZ9000 der Ligation des Xylose-Promotors mit pNZrecTLR.

Ansatz	Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
3:1 Ligation	0
7:1 Ligation	>300
10:1 Ligation	>300

Es wurden jeweils über 300 Klone der 7:1 und in der 10:1 Ligation gezählt. Aufgrund dessen wurden jeweils nur 30 Klone gescreent. Es wurden jeweils drei Mal zehn Klone zu einem Aufschluss gepoolt und somit pro Ligationsansatz drei Proben (mit zehn Klonen) per Gelelektrophorese untersucht. Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese ist in Abbildung 13 zu sehen.

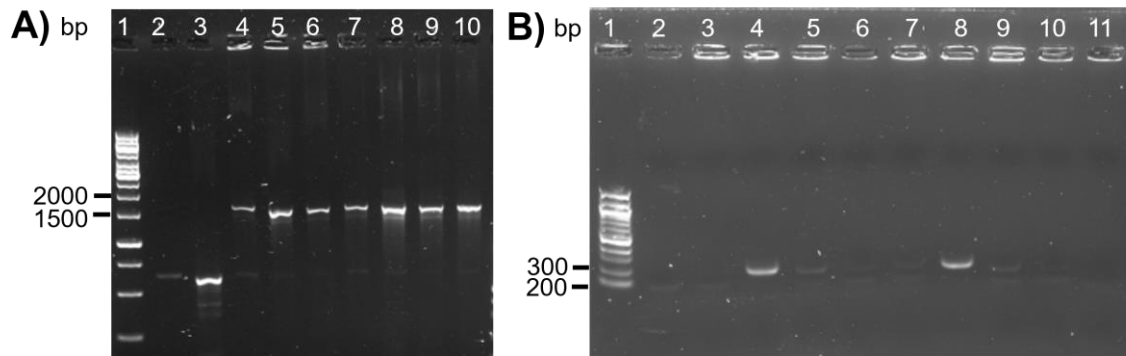


Abbildung 13: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis eines *Inserts* und des Xylose Promotors in pNZ8048. **A)** PCR, um *Insert* in pNZ8048 nachzuweisen. Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3: pNZ8048 Isolat ohne *Insert*, Bahn 4: pNZrecTLR Isolat, Bahn 5: 7:1-1, Bahn 6: 7:1-2, Bahn 7: 7:1-3; Bahn 8: 10:1-1, Bahn 9: 10:1-2; Bahn 10: 10:1-3. **B)** PCR um Xylose Promotor auf pNZrecTGV in Einzelkolonien nachzuweisen. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3-11: Einzelkolonien.

Da die gepoolten Klone positiv waren (s. Abbildung 13 A), wurden einzelne Kolonien daraus erneut gescreent. Von den erneut neun gescreenten Kolonien mit dem Hifi_Test_Fw Primer und dem pXylt_RBS_Rev Primer waren bereits zwei positiv (s. Bahn 4 und 8, Abbildung 13 B), sodass auf das weitere Screenen von Klonen verzichtet wurde. Das Ergebnis der Plasmide, die mit dem Hifi_Test_pNZ_Fw sequenziert wurden, zeigte, dass der Vektor pNZrecTGV vorlag. Das Ergebnis der Sequenzierung ist im Anhang in Tabelle 94 zu sehen. Die Plasmidkarte von pNZrecTGV ist in Abbildung 30 im Anhang abgebildet.

7.7 Transformation verschiedener Plasmide in *Lactococcus* spp.

Die Ergebnisse der Elektroporation verschiedener Vektoren in Zellen nach dem Standardprotokoll in GSM17 + 1 % Glycin sind in Tabelle 60 zu sehen.

Tabelle 60: Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 nach Elektroporation mit verschiedenen Plasmiden und Plasmidmengen. Sofern nicht anders beschrieben, erfolgte die Inkubation in GSM17 + 1 % Glycin.

Ansatz	Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 1 % Glycin	
320 ng pTRCas9.25AGly	0
77 ng pTRCas9.25AGly	0
154 ng pTRCas9.25AGly	0
77 ng pTRCas9.25AGly GM17	0
320 ng pNZ8048	8
176 ng pTRKH2	0
604 ng pTRKH2	0
422 ng pTRKH2	0
<i>L. lactis</i> LTH 7123 1 % Glycin	
320 ng pCas9.25AGly	0
320 ng pNZ8048	>300
176 ng pTRKH2	0
604 ng pTRKH2	0
422 ng pTRKH2	1
268 ng pTRCas9.25AGly	0

Die Ergebnisse der Kolonie-PCR von pNZ8048 aus den Starterkulturen sind im Anhang in Abbildung 36 zu sehen. Das Ergebnis des Nachweises von pTRKH2 in *L. lactis* LTH 7123 per Kolonie-PCR ist im Anhang in Abbildung 37 aufgeführt. Dieses Ergebnis zeigte, dass pTRKH2 sich vermutlich in *L. lactis* LTH 7123 transformieren ließe, jedoch war dieses Ergebnis nur als Zwischenergebnis zu betrachten, da der rekombinante Vektor pTRCas9.25AGly keine Transformanten nach der Elektroporation erzeugte. Der Vektor pNZ8048 war in *L. cremoris* LTH 7122 und in *L. lactis* LTH 7123 transformierbar. Es wurde zum Vergleich noch versucht, pTRCas9.25AGly in *L. cremoris* LTH 7122, der in GM17 inkubiert wurde, zu transformieren, das Ergebnis zeigte aber keine Transformanten.

Dadurch, dass keine Transformanten bei der Elektroporation mit pTRKH2-Derivaten, außer einmal für *L. lactis* LTH 7123, erzielt werden konnten, wurde eine Optimierung des Glycingehalts vorgenommen, um die Zellen bei einer optimierten OD₆₀₀ zu ernten und für die Elektroporation vorbereiten zu können.

7.8 Glycintoleranz der Starterkulturstämme

Da keine Transformation des rekombinanten Plasmids in die Starterkulturen durch das herkömmliche Protokoll erreicht wurde, wurde die Glycintoleranz der beiden Stämme ermittelt, um eine möglichst hohe Glycinkonzentration im Wachstumsmedium vor der Elektroporation zu erzielen, bei der gleichzeitig Transformanten entstehen können. Die OD₆₀₀ Messungen zu verschiedenen Glycinkonzentrationen nach einer ÜK sind in Tabelle 61 zu sehen.

Tabelle 61: Mittelwert und angepasste Standardabweichungen der OD₆₀₀ Messungen in Abhängigkeit von Glycin der ÜKs der Stämme *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123.

Glycin-Konzentration [%]	OD ₆₀₀ <i>L. cremoris</i> LTH 7122	OD ₆₀₀ <i>L. lactis</i> LTH 7123
0	2,03±0,02	2,32±0,05
1	1,19±0,20	0,90±0,06
2	0,94±0,02	0,011±0,007
3	0,67±0,03	0,007±0,003
4	0,016±0,005	0,004±0,002

Anhand dieser Ergebnisse wurde entschieden, eine Glycin Konzentrationen von 3,25 % für *L. cremoris* LTH 7122 und von 1,25 % bzw. 1 % für *L. lactis* LTH 7123 zu verwenden. Es wurde davon ausgegangen, hiermit eine optimale OD₆₀₀ von 0,2–0,7 nach Inkubation für 16 h wie bei Holo & Nes (1989) beschrieben zu erreichen.

7.8.1 Transformation von pNZrecTGV in Starterkulturen mit optimiertem Glycingehalt

Anschließend wurde mit dem optimierten Glycingehalt zunächst die Transformation von pNZrecTGV vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 62 zu sehen.

Tabelle 62: Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 nach Elektroporation mit pNZrecTGV. Als Vergleich wurde *L. cremoris* NZ9000 ebenfalls transformiert.

Ansatz Elektroporation pNZrecTGV	Transformanten im Gesamtansatz [KbE]
Kontrolle: <i>L. cremoris</i> NZ9000	>300
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 3,25 % Glycin	18
<i>L. lactis</i> LTH 7123 1 % Glycin	>300
<i>L. lactis</i> LTH 7123 1,25 % Glycin	>300

Nach der Elektroporation mit pNZrecTGV wurden 18 Kolonien von *L. cremoris* LTH7122 und 17 Kolonien von *L. lactis* LTH 7123 daraufhin untersucht, ob sie das Plasmid trugen. Die Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR ist in Abbildung 14 zu sehen.

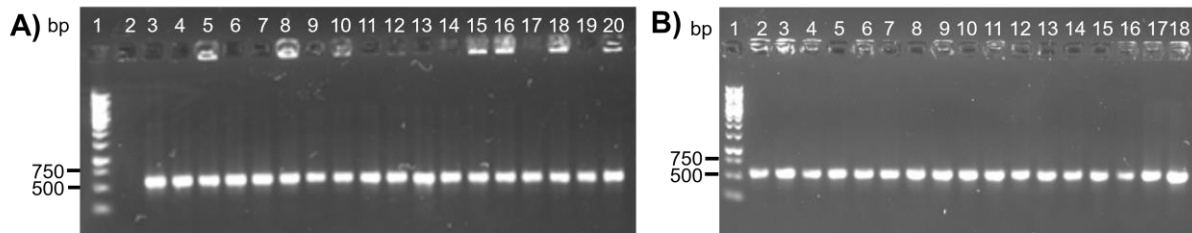


Abbildung 14: Agarose-Gelelektrophorese zur Herstellung von pNZrecTGV. **A)** Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC Bahn 3-20: Klon 1-18 *L. cremoris* LTH 7122; **B)** (NTC läuft auf Bahn 2 von A) Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2-18: Klon 1-17 *L. lactis* LTH 7123.

Alle gescreenten Klone trugen nach Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese das Plasmid pNZrecTGV. Dieses Ergebnis im Zusammenhang mit den Keimzahlen zeigte, dass das Plasmid mit einer hohen Effizienz in die beiden Starterkulturstämme elektroporierbar war. Die wenigen Kolonien von *L. cremoris* LTH 7122 bei 3,25 % Glycin deuteten darauf hin, dass dieser Glycingehalt zu hoch gewählt wurde.

7.8.2 Transformation von pTRKH2-Derivaten bei optimiertem Glycingehalt

Die Ergebnisse des Vorversuches ließen darauf schließen, dass mit einem höheren Plasmidgehalt die Transformation der pTRKH2-Derivate für den *L. lactis* LTH 7123 erfolgreicher wäre. Ein entsprechender Versuch mit angepasstem Glycingehalt wurde für die Starterkulturen wiederholt, indem die Glycingehalte aufgrund der zuvor bestimmten OD₆₀₀ aus Tabelle 61 verwendet wurden. Die Ergebnisse des Versuches mit höheren Plasmidkonzentrationen und angepasstem Glycingehalt sind in Tabelle 63 zu sehen.

Tabelle 63: Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122 und von *L. lactis* LTH 7123 bei verschiedenen Glycingehalten nach Elektroporation von pTRKH2 und dessen Derivaten. Als Vergleich wurde *L. cremoris* NZ9000 ebenfalls transformiert.

Ansatz	Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
<i>L. cremoris</i> LTH 7122	
3,25 % Glycin 710 ng pTRKH2	0
3,25 % Glycin 1 µg pTRKH2	0
3,5 % Glycin 710 ng pTRKH2	0
3,25 % Glycin 2 µg pTRCas9.25A	0
3,25 % Glycin 1 µg pTRCas9.25AGly	0
2 % Glycin 676 ng pTRKH2	0
<i>L. lactis</i> LTH 7123	
1,25 % Glycin 710 ng pTRKH2	33
1 % Glycin 1 µg pTRKH2	12
1,25 % Glycin 522 ng pTRCas9.25A	0
1 % Glycin 2 µg pTRCas9.25A	0
1,25 % Glycin 656 ng pTRCas9.25AGly	0
1 % Glycin 1 µg pTRCas9.25AGly	0
<i>L. cremoris</i> NZ9000	
1 % Glycin 1 µg pTRKH2	>300

Die Ergebnisse der Plasmidtransformation in die Starterkulturen zeigten, dass die rekombinanten Plasmide unter den getesteten Methoden nicht in die Starterkulturen transformiert wurden. Bei *L. lactis* LTH 7123 wurde vermutlich pTRKH2 erfolgreich transformiert, dies ist jedoch für die weitere Forschung nicht bedeutend, da es sich um einen leeren Vektor handelt. Die rekombinanten Plasmide pTRCas9.25A und pTRCas9.25AGly sind fast doppelt so groß wie der Vektor pTRKH2. Vermutlich ließen sich auch aufgrund der Größe diese Vektoren schlecht in die Starterkulturstämme transformieren. Des Weiteren ist das Rückgrat von pTRKH2 möglicherweise der Grund, wieso eine Transformation in *L. cremoris* LTH 7122 nicht erfolgreich war, da sich beispielweise pNZ8048 problemlos transformieren ließ. Die Ergebnisse zeigten, dass bei *L. lactis* LTH 7123 die Transformationseffizienz bezogen auf pTRKH2 von einem Klon auf 33 Klone gesteigert werden konnte. Es war jedoch auffällig, dass der Glycingehalt nicht alleinig ausschlaggebend ist, da mit 1 % Glycin und einer erhöhten Vektormenge von 1 µg ebenfalls Transformanten erzeugt werden konnten. Andere Plasmide, die ebenfalls das Rückgrat von pTRKH2 trugen, konnten nicht durch Erhöhung des Glycingehaltes und der Gesamtmenge an Plasmid in die Starterkulturen eingebracht werden. Das Zellpellet von *L. cremoris* LTH 7122 war bei einem Glycingehalt von 3,25 % sehr klein,

sodass eine Elektroporation bei 1 % Glycin, wie es in der Literatur beschrieben wird, erneut als Standard verwendet wurde. Außerdem zeigten die Ergebnisse für *L. cremoris* LTH 7122 einen großen Schwankungsbereich für die gemessene OD₆₀₀ für die Glycin-Konzentrationen zwischen 1 und 3 %. Bei einem geringeren Glycingehalt von 1 % im Vergleich zu 3 % eignen sich die Zellen vermutlich noch zur Transformation.

7.9 Konjugation des Plasmids pTRCas9.25A von *E. coli* WM3064 in *L. cremoris* LTH7122

Das Bild der Gelelektrophorese der Hitzeschock-Transformation der Plasmide pTRCas9.25A und pTRKH2 in *E. coli* WM3064 ist in Abbildung 15 zu sehen.

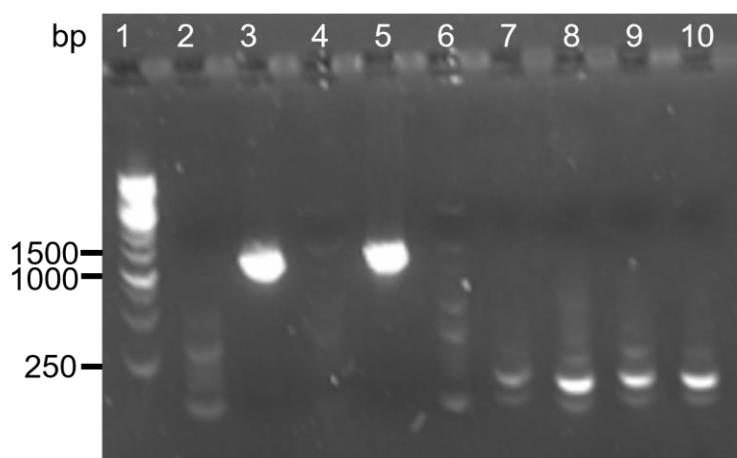


Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese der Hitzeschock Transformation von pTRCas9.25A und pTRKH2 in *E. coli* WM3064. Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC Cas9-Insert PCR, Bahn 2: Positiv-Kontrolle pTRCas9 Bahn 3-6: Klon 1-3 von Cas9-Insert PCR mit pTRCas9.25A, Bahn 7: NTC pTRKH2 PCR, Bahn 8-10: Klon 1-3 pTRKH2 PCR mit pTRKH2.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, war einer der drei Klone der pTRCas9.25A Transformation mit einer Bande bei ca. 1000 bp positiv. Alle drei Klone der pTRKH2 Transformation waren mit einer Bande bei ca. 150 bp positiv. Aus den Glycerol-Stocks der positiven Transformanten wurde anschließend die Konjugation durchgeführt.

Es war zunächst kein Bewuchs nach der Konjugation auf den Agarplatten zu erkennen. Es konnten keine *L. cremoris* LTH 7122 Klone auf den GM17 Agarplatten nachgewiesen werden.

Die Konjugation wurde wiederholt und es war auf den Platten immer nur eine durchsichtige, eventuell biologische Masse zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass zwar ein Bewuchs stattgefunden hat, diese Organismen aber nicht in Flüssigkultur anzüchtbar waren. Eine Sequenzierung und anschließender Abgleich mittels BLAST (Altschul et al., 1990) der 16S-rRNA Gen Sequenz der biologischen Masse zeigte, dass es sich bei der biologischen transparenten Masse um *E. coli* DNA handelte und somit keine Konjugation zu *Lactococcus* möglich war. Das Ergebnis der Sequenzierung ist im Anhang in Tabelle 95 zu sehen. Somit

war keine Konjugation von pTRCas9.25A oder pTRKH2 in *L. cremoris* LTH 7122 unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen möglich.

7.10 Transformation Xylose induzierter Starterkulturen und Nachweis mittels MAMA-PCR

Da bei der Induzierung mit Xylose nur das Reparatur-Template hinzugegeben wurde und somit kein Selektionsdruck auf die Zellen herrschte, handelte es sich um potenzielle Transformanten. Die Xylose induzierten *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 zeigten folgende potenzielle Transformanten (s. Tabelle 64).

Tabelle 64: Potenzielle Transformanten nach Xylose-Induzierung mit einzelsträngigem Reparatur-Template. Exp. = Exponentiell.

Stamm	Reparatur-Template	Potenzielle Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 pNZrecTGV exp. Phase	RepS620_FW_Gly 1:50	>300
	RepS620_RV_Gly OD ₆₀₀ 0,1	>300
	RepS620_FW_Stop 1:50	>300
	RepS620_RV_Stop OD ₆₀₀ 0,1	>300
	dsDNA Glycin	>300
<i>L. lactis</i> LTH 7123 pNZrecTGV exp. Phase	RepS620_FW_Gly OD ₆₀₀ 0,1	>300
	RepS620_RV_Gly 1:50	>300
	RepS620_FW_Stop OD ₆₀₀ 0,1	>300
	RepS620_RV_Stop 1:50	>300

Es konnte kein Unterschied zwischen der 1:50 Methode und der OD₆₀₀ 0,1 Methode bezüglich des Erhalts an potenziellen Transformanten festgestellt werden. Da das Reparatur-Template die Überhänge trug und somit nicht optimal für die Kombination mit einer Rekombinase geeignet war, und somit vermutlich nicht die optimale Vorlage war, wurden weitere Experimente mit diesen potenziellen Klonen und mit diesem ssDNA Reparatur-Template verworfen.

In dem Versuch mit den Zellen aus Ansatz Z wurde das doppelsträngige Reparatur-Template in *L. cremoris* LTH 7122 elektroporiert (dsDNA Glycin), um erste Test-Versuche der MAMA-PCR zu absolvieren. Die Verwendung von dsDNA wurde ebenfalls getestet, da bereits in der Literatur die Rekombinase RecT erwähnt wurde, die ssDNA und dsDNA zur Rekombination (Chen et al., 2021) verwendet. Es wurden über 300 potenzielle Transformanten erzeugt

(s. Tabelle 64), sodass zunächst eine kleine Stichprobe analysiert wurde. Testweise wurden zwölf potenzielle Transformanten gescreent, ob eine MAMA-PCR möglich war. Das Ergebnis der MAMA-PCR der getesteten Kolonien ist in Abbildung 16 zu sehen.

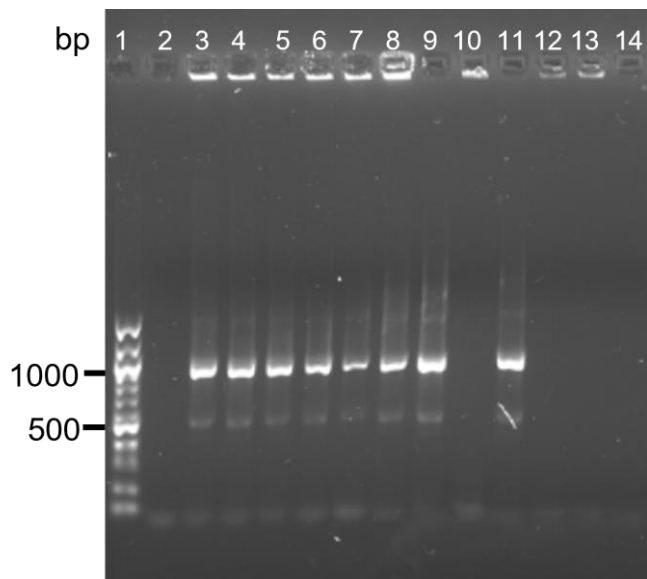


Abbildung 16: Agarose-Gelelektrophorese der MAMAPCRvrs0 PCR der potenziellen Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3-14: Klon 1-12.

Das Ergebnis in Abbildung 16 entsprach den Erwartungen einer MAMA-PCR. Bei acht von zwölf Kolonien, die mit dem dsDNA Glycin-Reparatur-Template elektroporiert wurden, war eine Bande bei 1000 bp, die dem Amplifikat der Wildtyp-Primer entspricht, und eine untere Bande bei 500 bp, die dem Amplifikat des Mutagenese-Primers und einem Wildtyp-Primer entspricht, zu sehen. Es ist davon auszugehen, dass die MAMA-PCR mit MAMAvrs0 funktionierte.

Daher wurde von den positiven MAMA-PCR Kolonien (acht Kolonien) gemäß Abbildung 16 eine PCR zur Überprüfung der Mutation, zur anschließend Sanger-Sequenzierung, durchgeführt. Außerdem wurde beruhend auf dem Ergebnis von MAMAvrs0, die MAMA-PCR zum Nachweis der Mutation optimiert. Diese Version wurde MAMAvrs1 genannt. Die finale Elongation wurde von 10 min auf 5 min verkürzt, da oberhalb der 1000 bp Bande eine leichte Bande zu sehen war (s. Abbildung 16), die aufgrund von Fehlamplifikationen entstanden sein konnte. Außerdem sollte die Bande bei 500 bp ausgeprägter zu sehen sein, daher wurde die Konzentration des Mutagenese-Primers in der Reaktion erhöht. Die MAMA-PCR MAMAvrs1 wurde an den Klonen 1-4 getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 zu sehen.

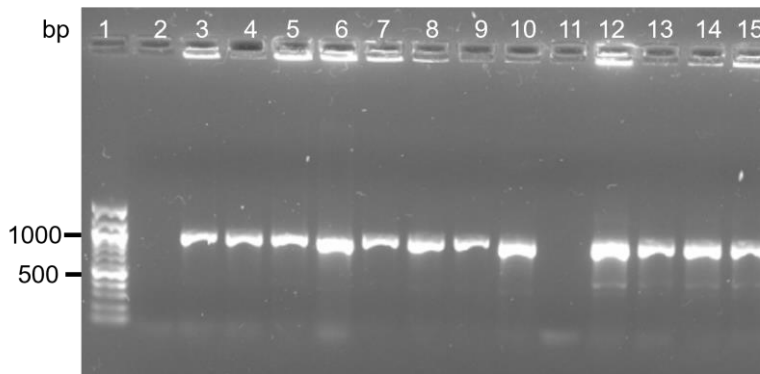


Abbildung 17: Agarose-Gelelektrophorese der PCR zur Überprüfung der Mutation der potenziellen Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122 aus der MAMAvrs0 PCR des dsDNA Glycin Versuchs, sowie die optimierte MAMAvrs1 PCR an Klon 1-4 von *L. cremoris* LTH7122 dsDNA Glycin Versuchs. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2: NTC Wild-Typ PCR, Bahn 3-10: PCR zur Überprüfung der Mutation vom Versuch *L. cremoris* LTH7122 dsDNA Glycin der Klone 1-7 und 9, Bahn 11: NTC MAMAvrs1, Bahn 12-15: Klonen 1-4 *L. cremoris* LTH 7122 MAMAvrs1.

Die Ergebnisse der PCR zur Überprüfung der Mutation in Abbildung 17 zeigten, dass bei allen getesteten potenziellen Klonen das Amplifikat den Erwartungen entsprach. Im Folgenden wurde entschieden, die potenziellen Klone 1, 5 und 9 (nummeriert nach Abbildung 16) von *L. cremoris* LTH 7122 sequenzieren zu lassen. Keiner der Klone war positiv (s. Tabelle 96 im Anhang). Die optimierte MAMA-PCR MAMAvrs1 (Bahn 11-15 in Abbildung 17) zeigte, dass die Bande bei 1000 bp auch nur mit 5 min finaler Elongation ausreichend zu sehen war und die Bande bei 1200 bp weniger stark ausgeprägt war. Abschließend kann davon ausgegangen werden, dass die finale Elongation bei 5 min ausreichend war. Durch die erhöhte Mutagenese-Primer-Konzentration konnte die Bande bei 500 bp nicht verstärkt werden. Aufgrund der Verwendung der MAMA-PCR wurden zwei Banden als Ergebnis erwartet: Eine Bande, die etwa 1000 bp groß ist, als Bande des Amplifikats ohne Mutation, und eine etwa 500 bp große Bande, die durch den Mutations-Primer erhalten wird. Die Bande der Mutationsprimer konnte weder bei MAMAvrs0 noch MAMAvrs1 deutlich erzeugt werden. Bei Verwendung einer PCR zur Überprüfung der Mutation konnte bei allen getesteten potenziellen Transformanten eine deutliche Bande erzeugt werden. Daher wurde dieses Amplifikat sequenziert, um eine Mutation in der Mitte des Amplifikats, zu verifizieren. Es konnte keine Mutation per Sequenzierung bestätigt werden. Unter Betrachtung der Ergebnisse der Sequenzierung kann somit gefolgert werden, dass die Klone mit MAMAvrs0 und MAMAvrs1 falsch positiv bewertet wurden.

7.10.1 Ergebnisse der MAMA-PCR von *L. lactis* LTH 7123

Da die bereits erhaltenen Ergebnisse nur auf Screenings von *L. cremoris* LTH 7122 basierten, wurde im Folgenden *L. lactis* LTH 7123 untersucht. Das Ergebnis der Elektroporation zeigte, dass eine Verdünnungsreihe bis 10^{-4} notwendig war, um einzelne Kolonien zu erhalten.

Eine Transformationseffizienz war jedoch nicht gegeben, da nur das Reparatur-Template in der Elektroporation hinzugegeben wurde und somit kein Selektionsdruck auf die Stämme wirkte. Es ließ sich daher auf der Agarplatte nicht unterscheiden, welche Kolonien das

Reparatur-Template aufnahmen und welche nicht. Deshalb wurde in allen nachfolgenden Versuchen zur Elektroporation des Reparatur-Templates immer bis Verdünnungsstufe 10^{-4} ausplattiert. Es wurden Kolonien von den Agarplatten der Verdünnungsstufen, durch die Einzel-Kolonien erhalten wurde, gescreent.

Von den Zellen aus Ansatz X (s. Tabelle 34) wurden 17 Kolonien von *L. lactis* LTH 7123 mit der MAMA-PCR MAMAvrs1 gescreent (s. Abbildung 18).

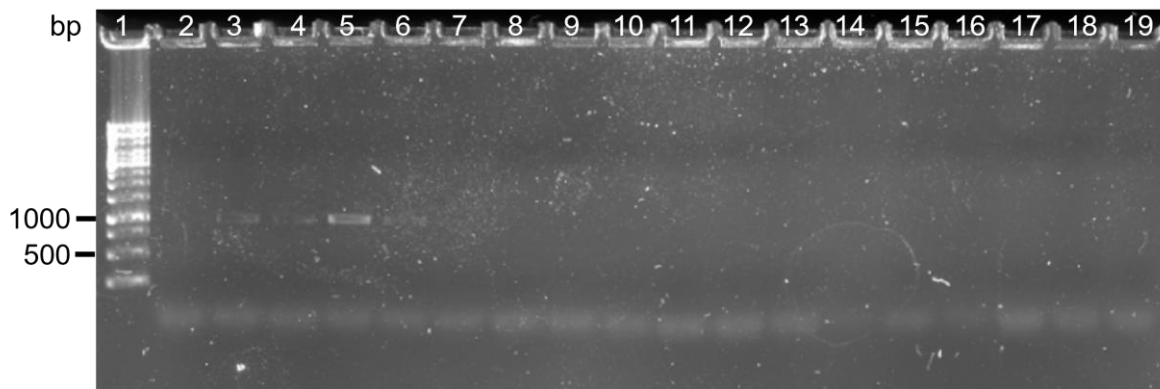


Abbildung 18: Agarose-Gelelektrophorese der MAMA-PCR des Ansatzes X der potenziellen Transformanten von *L. lactis* LTH 7123. Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC MAMAvrs1, Bahn 3-19: Klone *L. lactis* LTH 7123 MAMAvrs1 Ansatz X.

Wie in Abbildung 18 zu sehen, zeigte eine Kolonie eine stärkere Bande bei 1000 bp (Bahn 5). Diese wurde als Kontrolle weiterverwendet und M3X genannt. Jedoch zeigte keine Kolonie die Bande bei 500 bp an. Daraufhin wurden weitere Optimierungen vorgenommen.

Es wurde ein neuer Mutagenese-Primer designt, da der Primer S620S-MAMAF2 zwar an der mutierten PAM Sequenz bindet, jedoch nicht an der mutierten Aminosäure A620. Der Primer S620A-MAMAF21 hätte an die komplette Länge der Mutation gebunden, wenn diese kodiert worden wäre (s. Abbildung 19). Des Weiteren wurde der Wildtyp-Reverse-Primer verlängert, damit die Bande, die durch dieses Amplifikat erzeugt wurde, deutlicher bei der Gelelektrophorese zu sehen war.

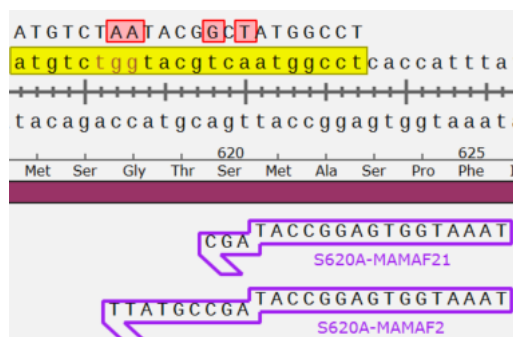


Abbildung 19: Ausschnitt des *prtP*-Gens erzeugt mit SnapGene®. In Rot markiert die Mutationen, die durch das Reparatur-Template S620Ala erzeugt werden würden. In Lila dargestellt die beiden Mutagenese-Primer der MAMA-PCR, die an die Sequenz hybridieren würden.

Weitere Screenings mit verschiedenen Primer-Kombinationen wurden an M3X sowie an drei weiteren Klonen (X1, X2, X3) aus der Elektroporation von Ansatz X vorgenommen. Außerdem

wurden die drei alten Primer (A steht für alter Primer, N steht für neuer Primer) mit dem PCR Programm MAMAvrs1.1 getestet, bei der die Zyklen-Anzahl auf 30 gesenkt wurde. Die Ergebnisse der verschiedenen Primer-Kombinationen, deren Amplifikate als Banden auf den Bildern der Gelelektrophorese zu sehen sind, sind in Tabelle 65 abgebildet.

Tabelle 65: Ergebnisse der Gelelektrophorese mit verschiedenen Primer Kombinationen für *L. lactis* LTH 7123.

Kombination	Forward-Primer	Mutagenese-Primer	Reverse-Primer	PCR Programm	Ergebnis [Banden bei Gel-elektrophorese]
AAA	S620S-MAMAF1	S620A-MAMAF2	S620S-MAMAR	MAMAvrs1.1	M3X 1000 bp, X2 <250 bp
ANA	S620S-MAMAF1	S620A-MAMAF21	S620S-MAMAR	MAMAvrs1.1	Keine
NAA	S620S-MAMAF11	S620A-MAMAF2	S620S-MAMAR	MAMAvrs1.1	M3X 1000 bp
NNA	S620S-MAMAF11	S620A-MAMAF21	S620S-MAMAR	MAMAvrs1.1	Keine

Da durch die MAMAvrs1.1-PCR ebenfalls eine Bande bei ca. 1000 bp bei M3X durch Kombination AAA erzeugt wurde, wurde dieses Programm mit den anderen Primer-Kombinationen weiterverwendet. Der Vorteil war, dass durch die reduzierte Zyklen-Anzahl eine geringere Möglichkeit der Fehlamplifikation bestand und eine Zeitersparnis möglich war.

Da keine Bande bei 500 bp, bei Verwendung des MAMAvrs1.1-PCR Programms, zu erkennen war, wurde wieder die MAMAvrs1-PCR verwendet und es wurden erneut Klone mit der Kombination AAA und NAA gescreent. Der Klon M3X zeigte bei AAA eine leichte Bande bei ca. 500 bp sowie bei NAA eine leichte Bande bei ca. 1000 bp. Anschließend wurde dieser Klon sequenziert (s. Tabelle 97 im Anhang). Das Ergebnis bestätigte, dass dieser Klon keine Mutation aufwies und somit das Ergebnis von der MAMAvrs1-PCR und den AAA Primern falsch positiv war. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte auch, dass *L. lactis* LTH 7123 nicht an Position 620, sondern an Position 618 im *prtP*-Gen die Aminosäure Serin aufwies, welche zur katalytischen Triade zählt.

Anschließend wurden elektrokompente Zellen von *L. lactis* LTH 7123 aus Ansatz Y (verschiedene OD₆₀₀ Werte) (s. Tabelle 34) und ein angepasster Mutagenese-Primer, der auf Serin an Position 618 passte, getestet. Es wurde die MAMAvrs4-PCR durchgeführt. Das Bild der elektrophoretischen Auftrennung ergab, dass keiner der Klone positiv war und auch nicht die Wildtyp-Bande bei 1000 bp zeigte. Nur bei der Kontrolle mit Klon M3X war wieder die

1000 bp Bande bei der MAMAvrs4-PCR (s. Abbildung 38 A im Anhang) zu sehen. Daher wurden die Optimierungen MAMAvrs4.1 und MAMAvrs4.2 vorgenommen und die PCR an einem Klon getestet, der jedoch negativ blieb.

7.10.2 Ergebnisse der MAMA-PCR von *L. cremoris* LTH 7122

Das Ergebnis der MAMAvrs1.1 mit *L. cremoris* LTH 7122 der Ansätze A1 und A2 zeigte, dass bei keinem der zwölf gescreenten Klone eine Mutation vorlag. Es war jedoch bei jeder Kolonie die 1000 bp Bande zu sehen, was darauf hindeutete, dass die Primer Kombination aus F1, F2 und R weiterhin die Geeignete war (s. Abbildung 38 B im Anhang).

Da der M3X Klon als falsch positiv gewertet wurde, konnte er als Referenz für die Optimierung der MAMA-PCR dienen. Es wurden die Primer in den Kombinationen F1 und F2 mit MAMAvrs1, F11 und F2 mit MAMAvrs1 und die Primer F1 und F21, sowie F11 und F21 mit MAMAvrs2 getestet. Hierzu wurde eine neue Kolonie des Ansatzes A1 *L. cremoris* LTH 7122 (XM17.1) und M3X als Vergleich gescreent. Die Ergebnisse sind Abbildung 20 abgebildet.

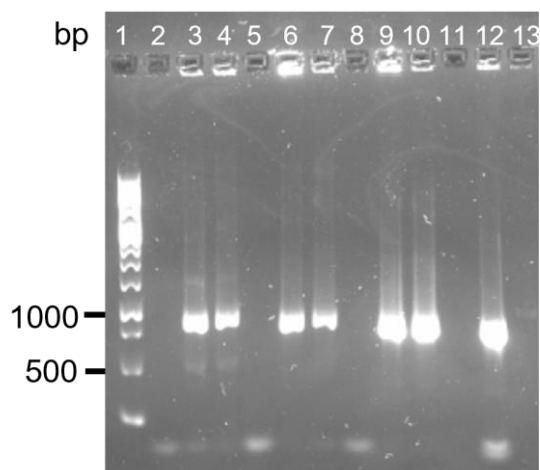


Abbildung 20: Agarose-Gelelektrophorese der MAMA-PCR der potenziellen Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122 mit MAMAvrs1 und MAMAvrs2. Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC vrs1 F1/F2, Bahn 3: M3X vrs1 F1/F2, Bahn 4: XM17.1 vrs1 F1/F2, Bahn 5: NTC vrs1 F11/F2, Bahn 6: M3X vrs1 F11/F2, Bahn 7: XM17.1 vrs1 F11/F2, Bahn 8: NTC vrs2 F1/F21, Bahn 9: M3X vrs2 F1/F21, Bahn 10: XM17.1 vrs2 F1/F21, Bahn 11: NTC vrs2 F11/F21, Bahn 12: M3X vrs2 F11/F21, Bahn 13: XM17.1 vrs2 F11/F21.

Das Bild der Gelelektrophorese (s. Abbildung 20) zeigte, dass die PCRs des MAMAvrs.1 PCR Programms unabhängig von der Primer-Kombination sind, die mit diesem Programm angewendet wurden, da bei allen Versuchen eine Bande bei 1000 bp zu sehen war. Außerdem war bei der Kombination der Primer F1 und F2 die Mutagenese-Bande zu sehen (s. Bahn 3 und Bahn 4, Abbildung 20). Da M3X jedoch nachweislich nicht positiv war, konnte dieses Ergebnis nicht als optimal bezeichnet werden, da es ebenfalls Kolonien als falsch positiv anzeigte. Die Kombination der Primer F11 und F2 schnitt hierbei besser ab, da keine Mutationsprimer-Bande bei Klon M3X (s. Bahn 6, Abbildung 20) zu sehen war, obwohl dieser Klon bereits vorher als falsch positiv angezeigt wurde. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen für den Klon M3X. Bei Programm MAMAvrs2 war die 1000 bp Bande für die

Primer F1/F21 sehr ausgeprägt (s. Bahn 9 und 10, Abbildung 20). Es ließ sich eine leichte Bande etwas unterhalb von 500 bp erahnen, sodass diese Kombination ebenfalls nicht optimal zur Detektion geeignet war. Positiv zu beurteilen war jedoch das Ergebnis, dass die 500 bp Bande bei dem Mutation-negativen Klon M3X im Vergleich zur Wildtyp-Bande nur leicht zu sehen war. Die Kombination F11/F21 funktionierte bei dem Klon XM17.1 nicht optimal, da eine leichte Bande über der 1000 bp Bande vom M3X aus der gleichen PCR zu erkennen war (s. Bahn 12 und 13, Abbildung 20). Bei der NTC waren keine Primer-Wolken zu erkennen (s. Bahn 11, Abbildung 20), im Gegensatz zu den anderen Primer-Kombinationen und PCR Programmen in Abbildung 20.

Da die Kombination F2/F11 am wenigsten Fehlamplikate bei 500 bp für M3X anzeigte, wurde diese Primer Kombination für ein weiteres Screening von Klonen aus dem A1 Ansatz verwendet. Der Klon aus der Optimierung (XM17.1) wurde ebenfalls verwendet. Da ausgeschlossen werden sollte, dass es zu einer Fehlampifikation durch Fehlbasenpaarung des Mutagenese-Primers kommt, wurde die MAMAvrs2-PCR verwendet, da hier die Anlagerungstemperatur um 1 °C höher war. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 zu sehen.

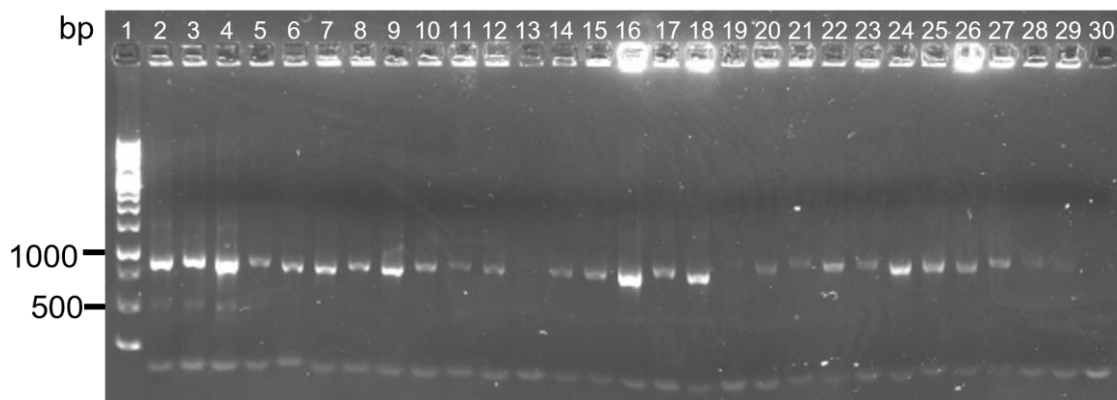


Abbildung 21: Agarose-Gelelektrophorese der MAMA-PCR MAMAvrs2 der potenziellen Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122. GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: XM17.1, Bahn 3-29: XM17.2-XM17.28, Bahn 30: NTC MAMAvrs2.

XM17.1 und zwei weitere Klone zeigten eine deutlichere Bande bei 500 bp (s. Bahn 1-3, Abbildung 21), sodass davon ausgegangen werden konnte, dass diese bezüglich der Mutation positiv waren. Somit wurde bei XM17.1 und XM17.2 eine PCR zur Überprüfung der Mutation durchgeführt. Anschließend wurden die Amplifikate der Klon XM17.1 und XM17.2 Sanger-sequenziert. Das Sequenz-Ergebnis ergab, dass beide Klone negativ waren und keine Mutation vorlag (s. Tabelle 98 im Anhang).

Bei dem PCR Programm MAMAvrs3 wurde als Optimierung die Anlagerungstemperatur auf 46 °C gesenkt und erneut XM17.1 und XM17.2 verwendet, um sicher zu sein, dass sich das Ergebnis der Sequenzierung ebenfalls als PCR darstellen lässt. Auch hier waren beide Klone negativ und zeigten nur die 1000 bp Bande.

Die Ergebnisse weiterer getesteter Primer-Kombinationen und Konzentrationen sind in Tabelle 66 zu sehen. Dabei wurde das Verhältnis der Primer angepasst, indem doppelt so viel Mutagenese-Primer wie Wildtyp-*Forward*-Primer verwendet wurden.

Tabelle 66: Primerkombinationen und -konzentrationen der MAMA-PCR von *L. cremoris* LTH 7122. S620S-MAMAF11: F11, S620GA-MAMAF2 = F2, S620S-MAMAR = R, S602G-MAMAF22 = 22.

Primerkombinationen und -konzentrationen	Ansatz	PCR Programm	Anzahl getesteter Klone/ Anzahl positiv auf 540 bzw. 545 bp Bande
F11, F2, R 10:10:10 pmol	B1/B2	MAMAvrs3	XM17: 29/1 (Klon 8.11) XSM17: 29/0
F11, F22, R 10:10:10 pmol	B3	MAMAvrs3	XSM17: 57/0
F11, F22, R 1:2:3 10:20:30 pmol	B3	MAMAvrs3	XSM17: 29/0
F11, F22, R 1:2:3 5:10:15 pmol	C1	MAMAvrs3	XSM17: 115/1 (Klon 27.11)
F11, F22, R 1:2:3 5:10:15 pmol	C2	MAMAvrs3	XSM17: 115/0
F11, F22, R 1:2:3 5:10:15 pmol	B4	MAMAvrs3	XSM17: 115/0

Der Klon 8.11 (s. Tabelle 66), der nach Auswertung über Gelelektrophorese der MAMA-PCR positiv schien, wurde mit einer PCR zur Überprüfung der Mutation amplifiziert und die DNA sequenziert. Diese war aber ebenfalls negativ (s. Tabelle 99 im Anhang). Das falsch negative Ergebnis könnte damit zusammenhängen, dass der S620A-MAMAF2 Primer mit dem *Reverse*-Primer eine Anlagerungstemperatur von 48 °C bei vollständiger Mutation hat. Somit konnte es bei Verwendung von MAMAvrs3 mit Anlagerungs-Temperatur von 46 °C folglich zu Fehlamplifikaten kommen. Der Klon 27.11 (s. Tabelle 66), der eine leichte Bande bei 500 bp zeigte, wurde mit einer PCR zur Überprüfung der Mutation erneut gescreent und sequenziert, die Sequenzierung zeigte keine Mutation (s. Tabelle 99 im Anhang).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde überprüft, ob das erstellte Konstrukt des Xylose Promotors und des *recT*-Gens durch Induzierung mit Xylose zu einer Expression von RecT führt (s. Abschnitt 6.15).

7.11 Elektroporation von pTRKH2-Derivaten in Xylose induzierte Starterkulturen

Im Weiteren wurde untersucht, wieso bei vorherigen Versuchen keine Kolonien gewachsen waren, wenn der pTRCas9.25A in die Starterkulturen elektroporiert wurde. Die These, dass

das CRISPR-Cas9 System so effektiv ist, dass alle möglichen Klone durch die Mutationskontrolle „weggeschnitten“ werden, sollte überprüft werden. Daher wurden *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123, die Xylose induziert wurden, verwendet, um durch die exprimierte Rekombinase und Co-Elektroporation des Reparatur-Templates eine höhere Anzahl an Transformanten zu erhalten. Die Ergebnisse des Elektroporationsversuches aus Tabelle 44 sind in Tabelle 67 zu sehen.

Tabelle 67: Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122 und von *L. lactis* LTH 7123 nach Xylose-Induzierung und pTRCas9.25A Elektroporation.

Stamm	Reparatur-Template + Vektor 150ng	Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 pNZrecTGV	10 µg Stop + pTRCas9.25A	0
	100 µg Stop + pTRCas9.25A	0
	10 µg Gly + pTRCas9.25A	0
<i>L. lactis</i> LTH 7123 pNZrecTGV	10 µg Gly + pTRCas9.25A	0

Aufgrund der Klonanzahl wurde davon ausgegangen, dass die Xylose-Induzierung und Zugabe von einem Reparatur-Template nicht dazu führte, dass eine Mutation stattfand. Die erhöhte Menge von 100 µg Reparatur-Template zeigte keine Auswirkungen auf die Transformationseffizienz. Bei Zugabe von dem pTRCas9 Vektor und dessen Derivaten konnte vermutet werden, dass dieser nicht in die Zelle aufgenommen wurde und deswegen keine Kolonien auf einer Agarplatte wuchsen, die selektiv für die Antibiotika-Resistenz auf diesem Vektor waren.

Es wurde überprüft, ob dies an der zugegebenen Menge an pTRCas9.25A lag und deshalb keine Kolonien wuchsen, da mit höherer Plasmidmenge an pTRKH2 (1000 ng statt 422 ng bei 1 % Glycin) auch mehr Transformanten von *L. lactis* LTH 7123 wuchsen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 68 zu sehen.

Tabelle 68: Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 nach Xylose-Induzierung und Elektroporation verschiedener Plasmide und Plasmidmengen. Als Vergleich wurde *L. cremoris* NZ9000 ebenfalls transformiert.

Stamm	Ansatz	Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
<i>L. cremoris</i> LTH 7122 pNZrecTGV	825 ng pTRCas9.25A + 10 µg Reparatur-Template Glycin	0
	1115 ng pTKRH2	0
	515 ng pTRCas9	0
<i>L. lactis</i> LTH 7123 pNZrecTGV	825 ng pTRCas9.25A + 10 µg Reparatur-Template Glycin	0
	1115 ng pTKRH2	1
	515 ng pTRCas9	0
Kontrolle: <i>L. cremoris</i> NZ9000	825 ng pTRCas9.25A	0
	1115 ng pTKRH2	103
	515 ng pTRCas9	127

Die Ergebnisse in Tabelle 68 zeigen, dass weder die Plasmidmenge noch die Zugabe des Reparatur-Templates einen Einfluss auf die Transformationseffizienz von pTRCas9.25A haben. Somit war nicht die Effizienz des CRISPR-Cas9 Systems der Grund, wieso von den Starterkulturstämmen bei dem vorherigen Versuch (s. Tabelle 67) keine Transformanten erhalten werden konnten. Auch pTKRH2 ließ sich nicht in *L. cremoris* LTH 7122 elektroporieren, obwohl dieser ebenfalls zur Spezies *L. cremoris*, wie NZ9000, zählt. Es ist festzustellen, dass pTKRH2 sich nicht nur bei Verwendung einer Übernackkultur und optimiertem Glycingehalt in den *L. lactis* LTH 7123 transformieren ließ (s. Ergebnis in Tabelle 63), sondern ebenfalls, wenn dieser sich in einer exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 0,4), aufgrund der Xylose-Induzierung, befand.

7.12 Vergleich von Transformationseffizienzen in *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123

Als Vergleich wurde versucht, weitere Plasmide mit verschiedenen Rückgraten in die Starterkulturstämme zu transformieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 69 zu sehen.

Tabelle 69: Relative Transformationseffizienzen verschiedener Plasmide in *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123. -: Keine Transformanten. +++: Hohe Transformationsrate ++: Mittlere Transformationsrate +: Geringe Transformationsrate.

Plasmide	<i>L. cremoris</i> LTH 7122 [relative Transformationsrate]	<i>L. lactis</i> LTH 7123 [relative Transformationsrate]
pGK12	+++	+++
pNZ9530	+	-
pMSP3535VA	++	++

Die Ergebnisse zeigten, dass tendenziell das Rückgrat von pGK12 am geeignetsten war, um in die Starterkulturen elektroporiert zu werden. Beim pGK12 war zu sehen, dass bei gleicher Menge Elektroporationsansatz bei *L. cremoris* LTH 7122, der in GSM17-Boullion + 3,25 % Glycin wuchs, nur zwei Transformanten wuchsen, wobei bei Verwendung von *L. cremoris* LTH 7122 Zellen, die in GSM17-Boullion + 1 % Glycin wuchsen, mehr als 300 Transformanten zählbar waren. Bei *L. lactis* LTH 7123 Zellen, die in GSM17-Boullion + 1,25 % Glycin wuchsen, waren ebenfalls über 300 Kolonien zählbar.

Des Weiteren wurde versucht pNZ9530 in die Starterkulturen zu transformieren. Dies funktionierte bei *L. cremoris* LTH 7122 nur bei einer einzigen Kolonie, obwohl der Versuch 3-fach durchgeführt wurde. Bei der Transformation von pNZ9530 in *L. cremoris* NZ9000, welcher ebenfalls in GSM17-Boullion + 1% Glycin über Nacht inkubiert wurde, konnten Transformationseffizienzen von über 300 Kolonien, bei gleicher Zugabe an Plasmid, erreicht werden.

Das Ergebnis der Transformation von pMSP3535VA in *L. cremoris* NZ9000 (GSM17-Boullion + 1 % Glycin als ÜK) waren über 300 Kolonien. Im Vergleich dazu wurden bei *L. cremoris* LTH 7122 (ebenfalls in GSM17-Boullion + 1 % Glycin als ÜK) bei einem Versuch 22 Transformanten erhalten und bei *L. lactis* LTH 7123 (GSM17-Boullion + 1 % Glycin als ÜK) zehn Transformanten gezählt. Bei dem Versuch der Transformation in *L. lactis* LTH 7123 Zellen, die bei OD₆₀₀ von 0,9 geerntet wurden, wurden keine Transformanten erhalten.

7.13 Vergleich der Methoden zur Nisin-Induzierung anhand der Transformationseffizienz

Um die Wirksamkeit des CRISPR-Cas9 Systems zu bestätigen, wurde der gal-*Spacer* aus der Veröffentlichung von Guo et al. (2019) verwendet, um festzustellen, ob das in dieser Arbeit entworfene System valide war. Zeitgleich wurde der oppDBind1-*Spacer* untersucht. Die Plasmide pTRCas9oppDBind1 und pTRCas9gal wurden in die verschiedenen induzierten Zellen transformiert. Die Ergebnisse als Transformanten sind in Tabelle 70 zu sehen. Hierbei

wurden vergleichend die nach Guo et al. (2019) erstellten Zellen ohne das Reparatur-Template elektroporiert, um die Effizienz des CRISPR-Cas9 Systems zu untersuchen.

Tabelle 70: Transformanten der verschiedenen Induzierungsmethoden bei Elektroporation mit entsprechendem Reparatur-Template (Rep). –: nicht ausplattiert.

Ansatz	pTRCas9oppDBind1 Transformanten Verdünnungsstufe [KbE]			pTRCas9gal Transformanten pro Verdünnungsstufe [KbE]		
	Uv.	10 ⁻¹	10 ⁻²	Uv.	10 ⁻¹	10 ⁻²
Guo ohne Rep.	880	69	-	0	0	-
Guo	408	56	7	3	0	0
Berlec 20	35	4	0	1	0	0
Berlec long	1	0	0	77	5	0

Die Ergebnisse der Elektroporation zeigten, dass bei Zugabe des pTRCas9oppDBind1 Plasmid plus Reparatur-Template wesentlich mehr Kolonien wuchsen, jedoch nicht bei den Zellen, die nach dem Verfahren „Berlec long“ hergestellt wurden.

Von den Klonen des pTRCas9gal Ansatzes wurden drei Guo-Klone, der eine Berlec 20-Klon und vier Berlec long-Klone sequenziert. Von den Klonen waren alle Guo-Klone und der Berlec 20-Klon positiv (s. Tabelle 100 im Anhang). Die Sequenzen der Berlec long-Klone waren überlagert und nicht auswertbar (s. Abbildung 40 im Anhang). Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen. Das etablierte Zwei-Plasmid-System aus pNZrecTLR und dem pTRCas9-Vektor mit passendem *Spacer* führte zu erfolgreichen Punktmutationen, obwohl die Sequenz von RecT im pNZrecTLR am N-Terminus sechs Aminosäuren Überhang hatte. Außerdem war dieses System sehr erfolgreich als Gegen-Selektionsmittel, da bei Zugabe des Plasmids ohne Reparatur-Template für den Vektor pTRCas9gal keine Transformanten ab 10⁻¹ zählbar waren.

Für die MAMA-PCR der Transformation von pTRCas9oppDBind1 wurden die Kolonie des Ansatzes Berlec long sowie die restlichen Ansätze durch jeweils poolen von neun Kolonien untersucht. So wurden vom Ansatz Berlec 20 noch 27 Kolonien untersucht sowie vom Ansatz Guo 36 Kolonien überprüft. Das Bild der Gelelektrophorese der MAMA-PCR zeigte bei allen Klon-Pools und beim Berlec 20-Klon die beiden zu erwartenden Banden (s. Abbildung 39 im Anhang). Von den Klonen wurde jeweils ein Klon der drei Ansätze von pTRCas9oppDBind1 sequenziert. Im Ergebnis waren alle Klone negativ (s. Tabelle 101 im Anhang). Um zu überprüfen, ob einer der anderen acht Klone des Guo-Klon Pools das Mutations-Amplifikat erzeugte, wurden die restlichen acht Klone der gepoolten Kolonien des Guo Ansatzes, von dem bereits ein Klon gescreent wurde, untersucht. Der Ansatz mit den Guo-Zellen wurde weiter analysiert, da durch dieses Verfahren bereits eine Mutation im *gal*-Gen eingebaut wurde

und somit die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Klon höher erschien. Außerdem sollte verhindert werden, dass die MAMA-PCR korrekt war, aber aus dem Ansatz genau der Klon sequenziert wurde, der nicht beide Amplifikate erzeugte. Daher wurde eine PCR zur Überprüfung der Mutation von den restlichen acht Klonen durchgeführt und anschließend das Amplifikat sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist im Anhang in Tabelle 102 zu sehen. Alle Klone waren ebenfalls negativ. Somit war die MAMA-PCR für die regulatorische Sequenz vor dem *oppD*-Gen nicht aussagekräftig. Die *oppDBind1*-Klone konnten nicht positiv sein, da hier der *Spacer* in falscher Orientierung zur PAM Site lag. Dies bestätigte ebenfalls die hohe Transformantenanzahl bei der alleinigen Zugabe des Plasmids. Wäre hierbei eine Gegen-Selektion erfolgt, wäre die Anzahl an Transformanten vermutlich geringer gewesen. Da aber vermutlich keine *Protospacer*-Seite mit dem *Spacer* *oppDBind1* gebunden wurde, fiel die Anzahl so hoch aus. Somit wurde der *Spacer* erneut mit der richtigen Orientierung zur PAM Seite designt. Dieser *Spacer* heißt *oppDBind2*.

7.14 Einbau von Punktmutationen in *L. cremoris* NZ9000 durch CRISPR-Cas9

Zunächst wurden, wie bei den Starterkulturen, kompetente Zellen mit einer OD₆₀₀ aus der exponentiellen Phase mit Zellen mit einer OD₆₀₀ aus der stationären Phase verglichen. Das Ergebnis der Transformation von pTRCas9codY3 in diese Zellen ist in Tabelle 71 abgebildet.

Tabelle 71: Transformanten des *L. cremoris* NZ900 mit OD₆₀₀ 0,83 und OD₆₀₀ 1,75 nach Transformation von pTRCas9codY3 mit entsprechendem Reparatur-Template (Rep) in Zellen, die mittels Induzierung nach Guo et al. (2019) hergestellt wurden.

Ansatz	Transformanten des Gesamtansatzes [KbE]
<i>L. cremoris</i> NZ9000 pNZrecTPG pTRCas9codY3 + Rep OD ₆₀₀ 0,83	0 21 11
<i>L. cremoris</i> NZ9000 pNZrecTPG pTRCas9codY3 + Rep OD ₆₀₀ 1,75	2 3 1

Von sechs Klonen aus dem Ansatz aus der stationären Phase und von sechs weiteren Klonen aus dem Ansatz aus der exponentiellen Phase wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Das Bild der Agarose-Gelelektrophorese zeigte bei allen Klonen die gewünschte Bande (s. Abbildung 22).

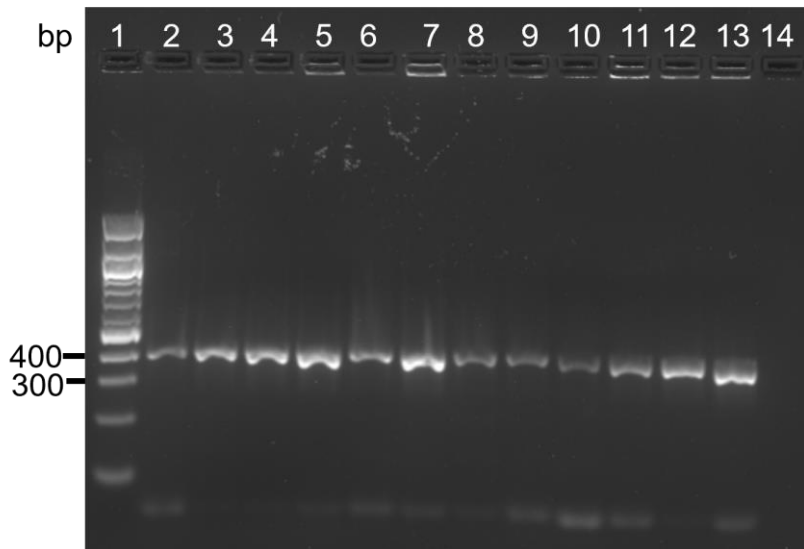


Abbildung 22: Agarose-Gelelektrophorese der PCR zur Überprüfung der Mutation des *codY*-Gens der pTRCas9codY3 Klone. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2-7: OD₆₀₀ 1,75 Klone, Bahn 8-13: OD₆₀₀ 0,83 Klone, Bahn 14: NTC.

Jeweils vier Klone der beiden Ansätze wurden Sanger-sequenziert. Von den getesteten Klonen des OD₆₀₀ 0,83 waren alle positiv und enthielten die Mutation. Von den getesteten Klonen des OD₆₀₀ 1,75 waren alle negativ und enthielten keine Mutation (s. Tabelle 103 im Anhang). Somit lässt sich festhalten, dass Zellen des *L. cremoris* NZ9000 in der stationären Phase bereits nicht mehr mutationsfähig waren, was die Ergebnisse der Berlec long-Transformanten bestätigte.

Durch die Ergebnisse der Transformation von pTRCas9codY3 konnte an Position 35 statt Leucin ein Stopcodon in die Sequenz des *codY*-Gens eingebaut werden. Somit konnte erfolgreich die Sequenz des *codY*-Gens in *L. cremoris* NZ9000 mutiert und der neue Stamm *L. cremoris* NZ9000*codY3 erzeugt werden.

Außerdem wurden die Plasmide pTRCas9oppDBind2 und pTRCas9codYLR untersucht. Durch den *Spacer* oppDBind2 lässt sich die Bindestelle von CodY vor dem *oppD*-Gen mutieren, sodass CodY diese nicht mehr erkennt. Mit dem *Spacer* codYLR lässt sich eine Mutation von Threonin 12 zu Isoleucin 12 und Alanin 13 zu Isoleucin 13 im *codY*-Gen erstellen, sowie die PAM Sequenz, die ebenfalls an dieser Position liegt, mutieren. Das Screening mittels Sequenzierung ergab nach Transformation von pTRCas9oppDBind2 sechs (von acht) positive Klone (s. Tabelle 104 im Anhang) und nach Transformation pTRCas9codYLR drei (von vier) positive Klone (s. Tabelle 105 im Anhang). Somit konnte durch die Verwendung des RecT/CRISPR-Cas9 Systems über alle verwendeten *Spacer* eine Mutationsrate von 75 % erreicht werden. Der neue Stamm *L. cremoris* NZ9000*oppDBind konnte erfolgreich hergestellt werden. Die Transformationseffizienzen und *Off-Target*-Effekte der verschiedenen *Spacer* wurden durch Transformation ebenfalls untersucht. In Tabelle 72 sind die Ergebnisse dieser Versuche der verschiedenen Vektoren zu sehen.

Tabelle 72: Vergleich der Transformanten von *L. cremoris* NZ9000 mit verschiedenen CRISPR-Cas9 Vektoren, sowie mit und ohne Reparatur-Template.

Ansatz [<i>L. cremoris</i> NZ9000 pNZrecTPG pTRCas9-Derivat]	Transformanten [KbE aus Gesamtansatz]	Transformanten ohne Reparatur-Template [KbE aus Gesamtansatz]	Transformanten ohne Reparatur-Template [KbE/100 ng Plasmid]
pTRCas9codY3	0 21 11	1 1 0	1,0
pTRCas9oppDBind2	5 4 0	8 5 10	8,0
pTRCas9codYLR	14 14 18	1 3 2	2,0
pTRCas9	1920 2288 1476		$1,9 \times 10^3$

Für pTRCas9 in Nisin induzierte Zellen nach Guo et al. (2019) konnte somit eine Transformationseffizienz von $1,9 \times 10^3$ KbE/100 ng Plasmid erzielt werden. Im Allgemeinen lässt sich festhalten, dass sich die Keimzahl im Bereich $<10^2$ bewegte, unabhängig von der Reparatur-Template Zugabe. Die Ergebnisse zeigten, dass das CRISPR-Cas9 System eine hohe Zielsequenz-Orientierung hat, da ohne Reparaturtemplate Zugabe nur 3,7 KbE/100 ng Plasmid gezählt wurden.

7.15 SDS-PAGE der Xylose- und Nisin-Induzierung von *L. cremoris* NZ9000

Da sich durch die MAMA-PCR keine positiven Transformanten bei Transformation eines Reparatur-Templates in Xylose induzierte Zellen zeigten, wurde überprüft, ob dies aufgrund eines Klonierungs- bzw. Expressionsfehlers von RecT geschah. Daher wurde eine Überprüfung der Expression des RecT Proteins mittels SDS-PAGE durchgeführt. Die Ergebnisse der Überprüfung der Xylose-Induzierung von *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTGV mittels SDS-PAGE sind in Abbildung 23 zu sehen.

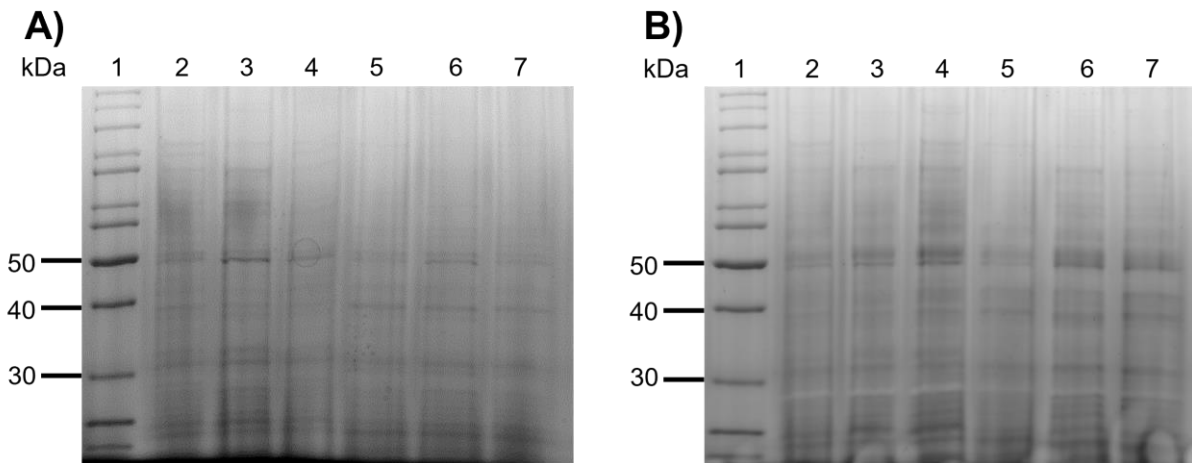


Abbildung 23: SDS-PAGE Gele des **A) Pellets** **B) Überstandes** der Xylose-Induzierung von *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTGV im Vergleich zu nicht induzierten Zellen aus M17 und GM17 Medium. Reihenfolge gilt für beide Gele. Ind = induziert. Bahn 1: PageRuler ungefärbte Proteinleiter, Bahn 2: M17 nicht Ind. Bahn 3: M17 Ind. Bahn 4: GM17 nicht Ind. Bahn 5: GM17 Ind. Bahn 6: XM17 nicht ind. Bahn 7: XM17 Ind.

Auf dem Bild des PAGE-Gel der Xylose-Induzierung war zu sehen, dass eine Überexpression der Rekombinase in *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTGV mit Xylose nicht funktionierte. Es war auch keine eindeutige Unterscheidung zwischen M17-Boullion und GM17-Boullion zu erkennen. Es war keine weitere auffällige Bande im erwarteten Bereich festzustellen.

Die Ergebnisse der Nisin-Induzierung zur Überexpression von RecT durch pNZrecTLR und pNZrecTPG sind in Abbildung 24 zu sehen.

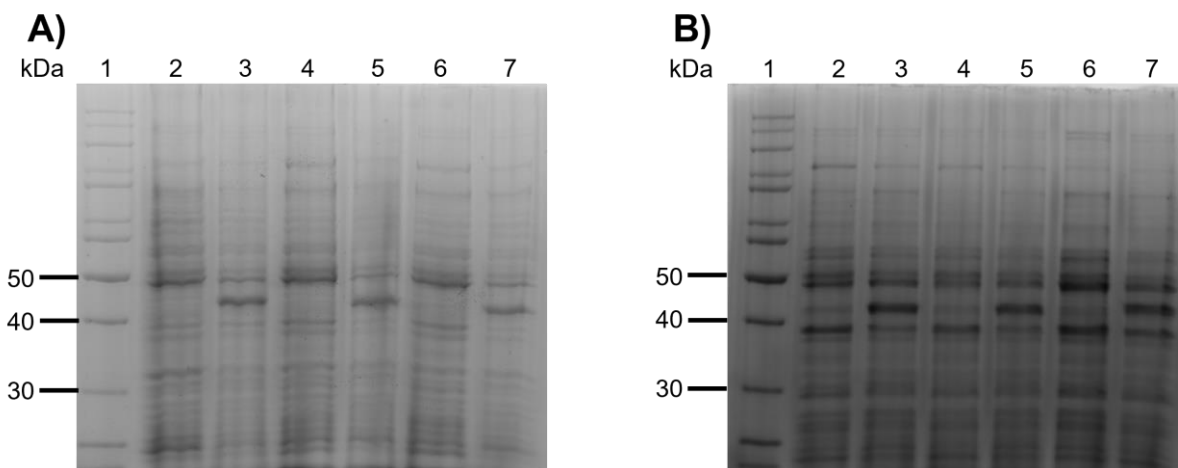


Abbildung 24: SDS-PAGE Gele des **A) Pellets** **B) Überstandes** der Nisin-Induzierung von *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTLR oder *L. cremoris* NZ9000 pNZrecTPG im Vergleich zu nicht induzierten Zellen. Reihenfolge gilt für beide Gele. Ind = induziert. Bahn 1: PageRuler ungefärbte Proteinleiter, Bahn 2: pNZrecTLR nicht ind. Bahn 3: pNZrecTLR ind. Bahn 4: pNZrecTPG 1 nicht ind. Bahn 5: pNZrecTPG 1 ind. Bahn 6: pNZrecTPG 2 nicht ind. Bahn 7: pNZrecTPG 2 ind.

Die Induzierung mit pNZrecTLR und mit pNZrecTPG zeigte eine deutliche Bande zwischen 40-50 kDa (s. jeweils Bahn 3, 5 und 7 in A und B in Abbildung 24), die in den Vergleichsproben, die nicht induziert wurden, nicht vorkam (s. Bahn 2, 4 und 6 in A und B in Abbildung 24). Bei den drei Ansätzen, die dem Isolat des Protein-Pellets entsprachen, war hierbei keine ähnliche Bande auf gleicher Höhe zu beobachten. Bei den Isolaten des Protein-Überstandes war bei den nicht induzierten Proben eine leichte Bande, ebenfalls zwischen 40-50 kDa erkennbar,

jedoch war die Intensität wesentlich geringer. Eine Verunreinigung der Proben war unwahrscheinlich, weil diese Bande nicht bei den Pellet- Proben sichtbar war und dieses Ergebnis reproduzierbar war. Es war eher davon auszugehen, dass es ein minimal kleineres Protein war. Bei genauem Betrachten fiel auf, dass die Bande leicht unterhalb der stark sichtbaren Bande verlief und nur aufgrund der Dicke der Bande der induzierten Proben von der gleichen Proteingröße ausgegangen wurde. Das Ergebnis der Bande zwischen 40-50 kDa entsprach nicht den Erwartungen, da bei der Expression von RecT ein Produkt von ca. 35 kDa zu erwarten war. Da dieses Phänomen bei pNZrecTLR und bei pNZrecTPG auftrat, ist unklar, ob die Sequenz der DNA hierfür verantwortlich war. Um sicherzustellen, dass durch Verwendung des NEBuilder® HiFi DNA Assembly das Stopcodon nicht versehentlich entfernt wurde und deswegen das *pepN*-Gen Stück, das stromabwärts des *recT*-Gens lag, mit transkribiert wurde, erfolgte eine PCR zum Nachweis des Stopcodons. Die PCR bestätigte, dass das Stopcodon durch das HiFi-Assembly nicht entfernt wurde und auch pNZrecTLR das Stopcodon kodiert hatte (s. Tabelle 106 im Anhang). Es ist davon auszugehen, dass dieses überlesen wurde und das restliche Fragment des *pepN*, welches hinter der MCS lag, mit dem *recT*-Gen zusammen abgelesen wurde. Daher traf dieses Phänomen auch bei beiden Plasmiden auf. Es lässt sich jedoch festhalten, dass dies anscheinend nicht RecT in seiner Funktion beeinträchtigte, da bei den CRISPR-Cas9 Experimenten positive Transformanten erhalten wurden.

7.16 Fermentationsversuch der Mutanten mit Milchsäure-Bouillon

Um zu überprüfen, ob die Mutationen der genregulatorischen Elemente des proteolytischen Systems einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten in Kasein-haltigem Medium haben, wurden die Mutanten mit MCB fermentiert. Die Ergebnisse der Fermentation der Mutanten im Vergleich zum Wild-Typ sind in Tabelle 73 dargestellt.

Tabelle 73: Keimzahl als Log₁₀ der KbE der verschiedenen Mutanten von *L. cremoris* NZ900 in MCB. Die ausgezählten Kolonien befinden sich in Tabelle 83 im Anhang.

Stamm	Keimzahl [Log ₁₀ KbE/mL]
<i>L. cremoris</i> NZ9000	8,92±0,07
<i>L. cremoris</i> NZ9000*codY	9,07±0,04
<i>L. cremoris</i> NZ9000*oppDBind	8,88±0,07

Die Ergebnisse der Fermentationsversuche sind laut Berechnung der Varianzanalyse (ANOVA) (Statistics Kingdom, 2017) nicht statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

7.17 Weitere Ergebnisse dieser Doktorarbeit: Sequenzierung und phylogenetische Einordnung der Starterkulturstämme

Als weiterer Teil dieser Arbeit wurde eine komplette Genomsequenzierung der beiden Stämme *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 durchgeführt und eine phylogenetische Einordnung vorgenommen. Die Ergebnisse wurden im Rahmen einer wissenschaftlichen Publikation in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift eingereicht.

Die Sequenzierung des kompletten Genoms wurde vorgenommen, um zu untersuchen, wie die Gene des proteolytischen Systems kodiert sind. Bereits vorher wurde davon ausgegangen, dass die beiden Stämme eine Vielzahl an endogenen Plasmiden besitzen. Die Ergebnisse bezüglich der Anzahl und Größe der Plasmide sind in Tabelle 74 zu sehen.

Tabelle 74: Komplette-Genom der Starterkulturstämme *L. cremoris* LTH7122 und *L. lactis* LTH 7123 nach Chromosom und Plasmidgröße in bp. -: Nicht vorhanden.

	<i>L. cremoris</i> LTH 7122 [bp]	<i>L. lactis</i> LTH 7123 [bp]
Chromosom	2.638.439	2.497.776
Plasmid A	64.642	69.871
Plasmid B	47.287	62.174
Plasmid C	-	57.892
Plasmid D	-	50.272
Plasmid E	-	41.393

Die Sequenzierung der Genome ergab, dass *L. cremoris* LTH 7122 zwei endogene Plasmide und *L. lactis* LTH 7123 fünf endogene Plasmide neben seiner chromosomalen DNA trug. Die phylogenetische Einordnung von *L. cremoris* LTH 7122 ist in Abbildung 25 zu sehen. Die phylogenetische Einordnung von *L. lactis* LTH 7123 ist in Abbildung 26 dargestellt. Die Stämme wurden hierzu entsprechend ihrer durchschnittlichen Nukleotid-Identität (Englisch: *Average Nucleotide Identity*, ANI) angeordnet.

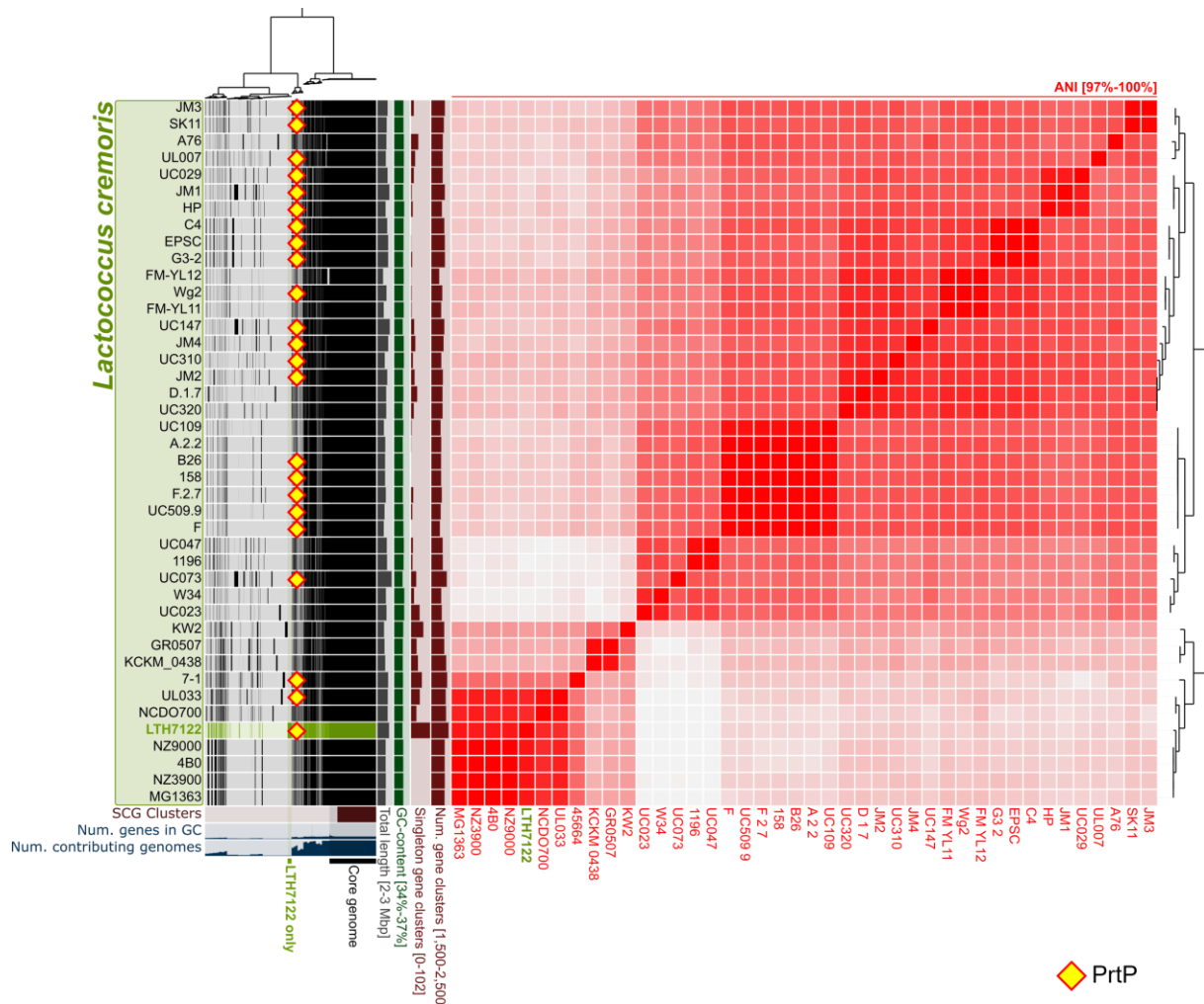


Abbildung 25: Pan-Genom-Analyse von 42 *L. cremoris* Stämmen: Zusammensetzung der Gencluster, Genomcharakteristika und phylogenetische Beziehungen. Die roten Vierecke sind die ANI-Werte von 97-100 %, je dunkler das Viereck desto höher der ANI-Wert der Stämme zueinander. (Erstellt mithilfe von Dr. Pablo Pérez-García, Zusätzliche Abbildung des Manuskriptes: Calcium-Dependent Transcriptional Responses alongside Genomic Characterization and Phylogenetic Relationships of *Lactococcus* spp. Dairy Starter Cultures, s. Manuskript zu Sequenzierung und phylogenetische Einordnung der Starterkulturstämme S. LXXI)

In Abbildung 25 ist zu sehen, dass es tendenziell zwei Cluster an *L. cremoris* Stämmen gab. Dies ist an der Intensität der roten Vierecke zu erkennen. Das eine Cluster, in dem sich *L. cremoris* LTH 7122 befand, bestand aus elf Stämmen, wobei dieses sich wieder in zwei kleinere Cluster mit einmal drei und einmal acht Stämmen unterteilte. Bei der phylogenetischen Einordnung konnte gezeigt werden, dass *L. cremoris* LTH 7122 hauptsächlich mit anderen milchassoziierten Stämmen ein Cluster bildete (ANI-Wert über 98,6 %). Der nächste Verwandte von *L. cremoris* LTH 7122 war nach Berechnung des ANI-Wertes *L. cremoris* MG1363, welcher ebenfalls aus Milch isoliert worden war.

Wie in Abbildung 26 zu sehen, zeigte der Pan-genomische Vergleich der *L. lactis* Stämme, dass sich die Stämme hauptsächlich in zwei etwa gleich große Cluster aufteilten. In dem Cluster oben rechts in der Ecke des Bildes herrschte eine hohe Homogenität, da fast keine farblichen Abgrenzungen zu erkennen sind. In dem anderen Cluster waren die Stämme phylogenetisch weiter voneinander entfernt, wie an der geringen Farbintensität zu erkennen ist. Die Stämme teilten sich erneut in zwei Unter-Cluster auf. Im Vergleich der Herkunft der *L. lactis* Stämme, bezogen auf ihre Verwandtschaft, waren die Cluster nicht so stark voneinander abgetrennt, wie bei *L. cremoris*. Bereits zum zweiten Cluster (ANI-Wert über 99,2 %) von *L. lactis* LTH 7123 zählten nicht-milchassoziierte Stämme. Nach Berechnung des höchsten ANI-Wertes war *L. lactis* subsp. *lactis* UL021 der nächste Verwandte von *L. lactis* LTH 7123. Daher wurde untersucht, ob die beiden Starterkulturstämmen ihre Plasmide durch horizontalen Gentransfer erhielten. Beispielhaft wurde hierzu das Plasmid, welches das *prtP*-

Gen trägt, untersucht. Durch phylogenetische Einordnung lässt sich schlussfolgern, dass *L. cremoris* LTH 7122 sein PrtP-Plasmid vermutlich durch horizontalen Gentransfer erworben hat, wobei *L. lactis* LTH 7123 sein PrtP-Plasmid vermutlich durch evolutionäre Prozesse erhalten hat.

8 Literaturgestützte Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit werden im Folgenden bezüglich Transformation und Rekombination in *Lactococcus* spp. diskutiert. Ein Ausblick über weitere Forschung sowie Forschungsdesiderate, insbesondere zur Nutzung von Rekombinationstechniken wie CRISPR-Cas9 zur Mutation von Genen des proteolytischen Systems in *Lactococcus* spp. Starterkulturstämme, wird vorgenommen.

8.1 Transformation in *Lactococcus* spp. und Optimierung durch Glycin-Konzentration

Die Transformation von Starterkulturstämmen mit dem Plasmid pTRKH2 und dessen Derivaten stellte sich im Verlauf der Untersuchungen zu dieser Arbeit als wenig effizient heraus. Aus diesem Grund werden im Folgenden vor allem die Transformationseffizienz von *Lactococcus* spp. Starterkulturstämmen sowie mögliche Ursachen für die beobachteten Einschränkungen diskutiert. Zunächst wurde das Verfahren nach dem Online-Protokoll der Eppendorf AG (2001) angewendet, da hierbei ausreichend Transformanten für *L. cremoris* NZ9000 erreicht werden konnten. Es konnte davon ausgegangen werden, dass dieses Verfahren sich auf die beiden Starterkulturstämme übertragen lässt. Bei dem Verfahren wird die Kultur bei einem Glycin-Gehalt von 1 % über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 inkubiert. Nach Anpassung des Glycin-Gehaltes (1–3,25 %) wurde zum Erhalt der aufgeführten OD₆₀₀ 0,5–2 µg Plasmid transformiert. Bei *L. lactis* LTH 7123 gelang die Transformation von pTRKH2, jedoch wurden nur wenige Transformanten erhalten. Im Vergleich dazu konnten durch das Protokoll für *L. cremoris* MG1363 Transformationseffizienzen von $1,4 \times 10^6$ KbE/µg DNA erzeugt werden (Eppendorf AG, 2001). Insgesamt wurden bei der Transformation von pTRKH2 in *L. lactis* LTH 7123 mit verschiedenen Bedingungen nur 1–33 Transformanten erzeugt. Diese Spannweite ist sehr gering und entspricht nicht der in der Literatur beschriebenen Größenordnung von 10^6 Transformanten. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Transformationseffizienz des Protokolls nach der Eppendorf AG (2001) für *L. cremoris* MG1363 angegeben ist. Dieser Stamm ist die Plasmid-freie Variante von *L. cremoris* NCDO 712. Die Transformationsraten können daher schlecht verglichen werden, da die Starterkulturstämme endogene Plasmide tragen. Des Weiteren wurde in dem Protokoll der Eppendorf AG das Plasmid pGK12 transformiert, das als RCR-Plasmid mit kleiner Größe als einfacherer zu transformieren gilt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen deutlich, dass das pGK12 Plasmid leicht zu transformieren ist.

Auch für pTRKH2 in *L. cremoris* NZ9000 konnten höhere Transformationseffizienzen als für *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 erzeugt werden. Holo & Nes (1989) konnten bei

Transformation von pIL253 Transformationseffizienzen von $6,3 \times 10^3 - 5,7 \times 10^7$ KbE/ μ g Plasmid bei verschiedenen *L. cremoris* Stämmen erzeugen. Der pIL253 ist das ursprüngliche Replikon des pTKRH2 (O'Sullivan & Klaenhammer, 1993) und somit mit diesem vergleichbar. Hierbei untersuchten Holo & Nes (1989) ebenfalls Stämme, die endogene Plasmide trugen. Der pTHCas9 Vektor (entspricht pTRCas9) hatte in der Studie von Guo et al. (2019) in *L. cremoris* NZ9000 vermutlich eine Transformationseffizienz von etwa $2,5 \times 10^5$ KbE/100 ng Plasmid, da bei der Datenauswertung von Guo et al. (2019) nicht schlüssig dargestellt wurde, ob dieses Ergebnis mit einem pTRKH2-Replikon oder dem pTRKL2-Replikon erzielt wurde. Da *L. cremoris* LTH 7122 eng mit *L. cremoris* NZ9000 verwandt ist, wie die Auswertung der pangenomischen Analyse zeigt, ist es verwunderlich, wieso bei diesem Stamm keine Transformation gelingen konnte. Jedoch bestätigt dies die These, dass die Transformationseffizienz stark stammspezifisch ist.

Das Ergebnis, dass pTRKH2 sich in verschiedenen Konzentrationen in *L. lactis* LTH 7123 elektroporieren lässt, aber dies nicht mehr der Fall ist, sobald die CRISPR-Cas9 Kassette enthalten ist, spricht dafür, dass die Größe ausschlaggebend für die Transformationseffizienz ist. Der pTRKH2 ist ca. 7000 bp groß und der pTRCas9 ca. 12000 bp. Die Beobachtung, dass größere Plasmide eine geringere Transformationseffizienz haben, konnte bereits für *B. subtilis* gezeigt werden (Ohse et al., 1995). Dennoch ist vermutlich nicht nur die Größe der Grund, weshalb pTRCas9-Varianten von *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 nicht aufgenommen werden. Beide Stämme tragen bereits Plasmide, die wesentlich größer sind, (über 60 kb) und somit wahrscheinlich die Stämme die Kapazität besitzen, größere Plasmide zu tragen. McIntyre & Harlander (1989) konnten Plasmide mit einer Größe von bis 30 kb in elektrokompente Zellen von *L. lactis* LM0230 transformieren, sodass ebenfalls davon ausgegangen werden kann, dass die pTRCas9-Derivate dieser Arbeit transformierbar sind. Jedoch handelt es sich beim *L. lactis* LM0230 um einen Plasmid-freien Stamm (McIntyre & Harlander, 1989) und dieser ist deshalb kaum mit den Starterkulturstämmen zu vergleichen.

Des Weiteren wurde geprüft, ob die Transformation in *L. cremoris* LTH 7122 womöglich nicht erfolgte, weil ein endogenes Plasmid bereits das gleiche Rückgrat trägt. Dies konnte aber nach Überprüfung der Plasmidsequenzen, die durch die Gesamtgenom-Sequenzierung erhalten wurden, ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls durch die Verwendung des pNZ9530 bestätigt. In einem ersten Transformationsversuch wurde pNZ9530 in *L. cremoris* LTH 7122 eingebracht, jedoch gelang dies nur mit einer einzigen Transformante. *L. cremoris* LTH 7122 wurde dafür mit 1 % Glycin inkubiert und hatte somit eine OD₆₀₀ von >1. Nach Anpassung der Methode (OD₆₀₀ <1), um zu untersuchen, ob dies an der stationären Phase lag, konnten keine weiteren Transformanten erzeugt werden (Schuster, 2025a). pNZ9530 konnte in *L. cremoris* LTH 7122 pNZrecTPG mit 60 KbE/ μ g und 190 KbE/ μ g Plasmid

transformiert werden. Dies gelang jedoch nur bei Zellen die sich schon in der stationären Phase bei OD₆₀₀ 1,4 und OD₆₀₀ 1,7 (Schuster, 2025b) befanden. Interessanterweise war somit die Transformationseffizienz höher als bei *L. cremoris* LTH 7122 ohne zusätzliches rekombinantes Plasmid. Dies scheint in keiner Abhängigkeit zur Wachstumsphase von *L. cremoris* LTH 7122 zu stehen, da bei Transformation von pNZ9530 ohne zusätzliches Plasmid ebenfalls Zellen, die sich bei einer OD₆₀₀ >1 befanden, verwendet wurden. Infolgedessen ist plausibel, wieso pTRKH2 (gleiches Rückgrat, ca. 3000 bp größer) nicht in *L. cremoris* LTH 7122 Zellen, die der Wachstumsphase OD₆₀₀ >1 entsprachen, transformiert werden konnte.

Der pNZ9530-Vektor und der pTRKH2-Vektor sind nach qualitativer Aussage in die Starterkulturstämme transformierbar. Daher ist es unwahrscheinlich, dass aufgrund des pAMβ1-Replikationsursprungs die pTRCas9-Derivate nicht in *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 transformierbar sind.

Gegen die Theorie der Abhängigkeit der OD₆₀₀ spricht, dass pTRCas9 sich weder bei Zellen von *L. lactis* LTH 7123, die über Nacht inkubiert wurden, noch bei Zellen, die im Bereich OD₆₀₀ 0,4 waren, transformieren lässt. Dies unterstreicht, dass der Zustand der Zellen, bezogen auf die stationäre oder exponentielle Phase, wohl nicht der Hauptgrund für die Nicht-Transformierbarkeit ist. *L. cremoris* LTH 7122 konnte nicht mit pTRCas9.25A transformiert werden, wenn der Stamm in GM17 über Nacht inkubiert worden war und somit eine OD₆₀₀ von vermutlich >2,0 entwickelt hatte. Beim pMSP3535VA jedoch konnten Transformanten in der stationären Phase (OD₆₀₀ von 2,0–2,4) von *L. cremoris* LTH 7122 und von *L. lactis* LTH 7123 mit einer Transformationseffizienz von $8,8 \times 10^2$ KbE/μg DNA für den *L. cremoris* LTH 7122 und $3,8 \times 10^2$ KbE/μg DNA für *L. lactis* LTH 7123 (Rudolph, 2025) erzeugt werden. Diese beiden Ergebnisse zeigen, dass nicht allein die OD₆₀₀ ausschlaggebend für die Transformationseffizienz eines Stammes ist.

Bezüglich der verwendeten OD₆₀₀ zur Transformation von *Lactococcus* spp. gab es in den letzten Jahren viele verschiedene Herangehensweisen: Kim et al. (1996) erreichten die maximale Effizienz von $2,2 \times 10^8$ Transformanten/μg DNA bei OD₆₀₀ 0,95. Die Autoren stellten heraus, dass ihr Ergebnis von bereits veröffentlichten Studien abweicht, die die höchste Effizienz in der frühen oder mittleren exponentiellen Phase ermittelt haben. Bei Guo et al. (2019) wurden die Zellen von *L. cremoris* NZ9000 bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert, bevor die Plasmide per Elektroporation transformiert wurden. Die Autoren beschreiben jedoch nicht, unter welchen Bedingungen sie pL-recT in *L. cremoris* NZ9000 transformiert haben. In dem Protokoll von Holo & Nes (1989) wurden die Zellen des *L. cremoris* BC101 bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2–0,7 inkubiert und die Autoren erhielten Transformanten bis $5,7 \times 10^7$ KbE/μg DNA pIL253. In dem Protokoll von Song et al. (2021) wurden die Zellen von *L. cremoris* NZ9000 bis

OD₆₀₀ 0,2 inkubiert und abweichend zu den anderen Protokollen mit Lithium-Acetat-Dihydrat weitere 30 min behandelt und anschließend erst gewaschen. Bei McIntyre & Harlander (1989) wurden die Zellen bei den OD₆₀₀ Werten von 0,2; 0,45; 0,7 und 1,2 inkubiert, und es wurde die größte Anzahl an Transformanten bei Zellen bei OD₆₀₀ 1,2 mit $1,0 \times 10^3$ KbE/ μ g DNA für pGB301 mit 9,8 kb erhalten. Für pLM2001 mit 30 kb erreichten die Autoren eine Transformationseffizienz von $1,1 \times 10^3$ KbE/ μ g DNA bei Zellen aus der stationären Phase (McIntyre & Harlander, 1989). Die Ergebnisse von *L. cremoris* NZ9000 in dieser Arbeit zeigen ebenfalls, dass Transformanten in der stationären Phase bei einer OD₆₀₀ von 1,75 erzeugt werden konnten.

All diese Studien belegen, dass unterschiedlichste Wachstumsphasen für *Lactococcus* spp. verwendet werden können, um Transformanten zu erhalten und es keine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Wachstumsphase und den erhaltenen Transformanten gibt. Die Untersuchungen von Wang et al. (2020) zu Milchsäurebakterien weisen darauf hin, dass die bestehenden Transformationsverfahren häufig eine schlechte Reproduzierbarkeit, eine geringe Transformationseffizienz oder eine komplexe Handhabung aufweisen. Es sei demnach schwierig, externe DNA erfolgreich zu transformieren. Dies schränkt die Konstruktion von rekombinanten Stämmen ein (Wang et al., 2020). Diese Beobachtung stützt die Ergebnisse zu den Transformationseffizienzen der Starterkulturstämme. Es konnte durch die Vielzahl der Versuche bestätigt werden, dass, bezogen auf die Elektroporation, die Effizienz nicht nur Spezies-abhängig sondern auch Stamm-abhängig für Milchsäurebakterien ist (Wang et al., 2020). Dies unterstreicht, dass die beiden Starterkulturstämme zum Teil stark in der Anzahl an Transformanten von *L. cremoris* NZ9000 abweichen.

Ein weiterer Grund für die Nicht-Transformierbarkeit ist das Restriktions-Modifikations-System des Wirtes: Alegre et al. (2004) transformierten *Lp. plantarum* mit pRS4C1 isoliert aus *E. coli* und konnten keine Transformanten generieren, wobei bei Verwendung von pRS4C1 isoliert aus *Lp. plantarum* $5,8 \times 10^5$ Transformanten/ μ g DNA generiert werden konnten. Wenn jedoch ein solches Restriktions-Modifikations-System in den Starterkulturstämmen aktiv wäre, würde sich pNZ9530 deutlich besser als pTRKH2 durch Elektroporation in die Starterkulturstämme transformieren lassen, da dieser aus *L. cremoris* NZ9000 isoliert worden ist. Dies ist jedoch nicht der Fall, sodass von einem aktiven Restriktions-Modifikations-System in den Stämmen abgesehen werden muss.

Zudem wurden in dieser Arbeit nur punktuell Kulturen einer definierten optischen Dichte im Bereich exponentielle Phase und stationäre Phase untersucht. Weitere Verfahren, wie beispielsweise die Verwendung von Zellen, die sich bei OD₆₀₀ von 0,2 befinden, sollten untersucht werden, auch wenn diese OD₆₀₀ bei vergleichenden Versuchen zur OD₆₀₀ weniger KbE/ μ g Plasmid erzeugte als Zellen mit OD₆₀₀ >1 (McIntyre & Harlander, 1989). Es wäre

sinnvoll, den kompletten OD₆₀₀-Bereich von 0,1–2,0 abzudecken und jeweils die Zellen auf OD₆₀₀ von 1,0 aufzukonzentrieren, um auszuschließen, dass aufgrund der Zellmenge keine Transformation möglich ist.

Da die Transformation der pTRCas9-Derivate in die beiden Starterkulturstämme *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 nicht mit den Methoden, die in dieser Arbeit angewendet wurden, funktioniert hat, bedarf es weiterer Forschung. Um sicherzugehen, dass die pTRKH2-Derivate aufgrund ihrer Größe nicht elektroporierbar sind, sollte in weiteren Versuchen ein kleineres Replikon mit dem pAMβ1-Replikationsursprung als Rückgrat für die Konstruktion des Caa9-Vektors verwendet werden, insofern dies möglich ist. Anderenfalls wäre es sinnvoll, die Option eines kleineren Rückgrats, beispielsweise eines RCR-Plasmids, mit der CRISPR-Cas9 Kasette zu kombinieren, um somit in der Gesamtgröße ein kleineres Plasmid als das pTRCas9 zu erhalten. Es sollte jedoch beachtet werden, dass speziell pTRKH2 sich dadurch auszeichnet, auch bei großen *Inserts* stabil zu sein (O'Sullivan & Klaenhammer, 1993).

Auf pNZ8148 wurde bereits von Berlec et al. (2018) eine CRISPR-Cas9 Kasette kloniert, die, trotz des großen *Inserts*, keine Auswirkungen auf die Plasmidstabilität hatte. Daher sollte in weiterer Forschung ebenfalls untersucht werden, ob eine Transformation der in dieser Arbeit verwendeten CRISPR-Cas9-Kassette in die Starterkulturstämme möglich ist, wenn diese auf einem Plasmid mit pSH71-Replikationsursprung liegt.

8.2 Konjugation bei *Lactococcus* spp.

Innerhalb der *Lactococcus* Spezies wurden Konjugationen bereits in den 1980er Jahren durchgeführt (McKay et al., 1980; Steele & McKay, 1989). So wurde gezeigt, dass über Konjugation die Lactose-fermentierende Eigenschaft übertragen werden konnte (McKay et al., 1980). In verschiedenen früheren Studien wurde dargelegt, dass *Lactococcus* spp. konjugationsfähig sind: Zunächst zeigten Gasson et al. (1995), dass der Sex-Faktor von *L. cremoris* MG1363 mit einem Tetracyclin-Resistenzgen kombiniert durch ein Plasmid auf weitere *Lactococcus* spp. Stämme übertragen werden kann. Das pAMβ1-Plasmid konnte von *E. faecalis* zu *Lc. casei* durch Konjugation transferiert werden (Gibson et al., 1979). Bei Ammann et al. (2008) wurde der Plasmidtransfer durch Transduktion, also Phagen-vermittelt, durchgeführt.

Jedoch ist eine geringe Forschungsintensität auf dem Gebiet Konjugation rekombinanter Plasmide bei *Lactococcus* spp. festzustellen. In *Review*-Artikeln der letzten Jahre sind ebenfalls nur wenige Informationen zur Konjugation rekombinanter Plasmide oder Spezies übergreifend zu *Lactococcus* spp. zu finden (Cho et al., 2020; Kok et al., 2017). Dies unterstreicht das Ergebnis dieser Arbeit, dass eine Konjugation von *E. coli* zu *Lactococcus* spp. unter den angewandten Bedingungen nicht möglich ist und noch weiterer

Forschungsbedarf besteht. Die Übertragung eines für die Konjugation modifiziertem pTRCas9 Plasmids von *L. cremoris* NZ9000 auf einen der Starterkulturstämme scheint möglich, erzeugt jedoch einen hohen Screening Aufwand und eine Zell-Vereinzelung, damit diese auf den finalen Platten getrennt vorliegen. Charneco et al. (2021) umgingen dieses Problem, indem sie eine Konjugation zu *L. cremoris* MG1614 oder *L. cremoris* NZ9000 mit pJP005 und dem Konjugations-Plasmid pNP40 induzierten. pNP40 trägt ein Nisin-Resistenzgen. Als Konjugations-Plasmid der Spezies *L. lactis* wurde es bereits 1984 im Stamm *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC3 entdeckt (McKay & Baldwin, 1984). *L. cremoris* MG1614 ist Plasmid-frei und resistent gegenüber Streptomycin, durch das eine Gegenselektion erzeugt werden kann. Bei *L. cremoris* NZ9000 trägt pJP005 eine Chloramphenicolresistenz. Die Transkonjuganten konnten ermittelt werden, da pNP40 ein Konjugations-Plasmid ist und somit über Konjugation übertragen werden kann, pJP005 jedoch nicht. Somit konnte beim gemeinsamen Auftragen vom *L. cremoris* NZ9000 und *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC3 eine Selektion durch Verwendung von Chloramphenicol plus Nisin erfolgen. Interessanterweise konnten die Autoren eine Co-Mobilisation der weiteren Plasmide von *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC3 bei Konjugation von pNP40 feststellen. So wurden zwei weitere, kleine Plasmide von *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC3 ebenfalls auf *L. cremoris* MG1614 übertragen (Charneco et al., 2021). Dieses Erkenntnis kann bei weiteren Versuchen der Transformation von pTRCas9 in die Starterkulturstämme hilfreich sein, insofern, ob dieser eventuell über Co-Mobilisation übertragen werden kann. Jedoch ist anzumerken, dass die bei Charneco et al. (2021) co-übertragenen Plasmide mit 5824 bp und 3357 bp wesentlich kleiner als pTRCas9 sind.

8.3 CRISPR-Cas9 in Milchsäurebakterien

CRISPR-basierte Gen-Editierungswerkzeuge wurden bereits in einer Vielzahl von Milchsäurebakterien-Stämmen angewendet. Oh & van Pijkeren (2014) waren Pioniere der Anwendung der CRISPR-Technologie zur Gen-Editierung in Milchsäurebakterien. Sie verwendeten ein Dreifaches-Plasmid-System, auf dem RecT von einem Plasmid exprimiert wurde und ein weiteres Plasmid Cas9 und die tracrRNA enthielt. Ein drittes Plasmid, welches die crRNA kodiert hatte, sowie ein Reparatur-Template wurden final transformiert (Oh & van Pijkeren, 2014). Dieses Verfahren ist jedoch recht zeitaufwändig, da es eine zweifache Transformation direkt hintereinander erfordert.

Bei der Studie von Guo et al. (2019) wurde ein Zwei-Plasmid-System verwendet, auf dem das in dieser Arbeit verwendete System beruht. Die Autoren verwendeten als Rückgrat für den CRISPR-Cas9 Vektor ebenfalls pTRKH2 und klonierten darauf die CRISPR-Cas9 Kasette des pCas9 Vektors (#Addgene 42876). Als zweiten Vektor verwendeten sie pSec:LEISS:Nuc, welcher als Rückgrat, laut Miyoshi et al. (2006), pWV01 trägt und laut Ribeiro et al. (2002) ein

Abkömmling von pNZ8010 ist und somit als Rückgrat pSH71 trägt. Die Rekombinase kommt bei Guo et al. (2019) ebenfalls von *E. faecalis* ATCC14506, jedoch mussten für die Verwendung im pNZ8048 die Schnittstellen angepasst werden. Dennoch lässt sich festhalten, dass das hier verwendete Zwei-Plasmid-System, mit dem Mutationen im *L. cremoris* NZ9000 erzeugt wurden, eine hohe Ähnlichkeit zu dem System von Guo et al. (2019) hat. Die Versuche an *L. cremoris* NZ9000 zeigen, dass dieses System, wie beschrieben, eine hohe Gegenselektionsrate hat, da die Anzahl der erhaltenen Transformanten im Durchschnitt im unteren zweistelligen Bereich lag.

Bei Guo et al. (2019) wurden folgende Transformationseffizienzen als KbE/100ng Plasmid für die gelisteten Gene für den Vektor pTRKL2 ermittelt: 80,5 (*galK*-Spacer), 56,0 (*hemN*-Spacer), 46,0 (*recA*-Spacer) und 55,5 (*noxD*-Spacer). Die Werte, die in dieser Arbeit erzielt wurden, sind als Mittelwert der KbE/100 ng Plasmid (gerundet): 1,0 (*codY3*), 2,0 (*codYLR*) und 8,0 (*oppDBind2*). Für pTLCas9 erreichten Guo et al. (2019) eine Transformationseffizienz von $2,7 \times 10^5$ KbE/100 ng Plasmid. Bei Verwendung von induzierten Zellen nach Guo et al. (2019) und Verwendung von pTRCas9 wurde in dieser Arbeit $1,9 \times 10^3$ KbE/100 ng Plasmid erzielt. Somit sind die Keimzahlen pro 100 ng Plasmid, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, wesentlich geringer als die von Guo et al. (2019). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass der *high-copy* Vektor pTRKH2 als Rückgrat bei den hier vorliegenden Ergebnissen verwendet wurde und bei Guo et al. die Werte aus einem Experiment mit dem *low-copy* Vektor pTRKL2 stammen. Für pTLCas9 mit *Spacern* wurde bei Guo et al. (2019) eine Reduktion der Keimzahl von 3,7 log₁₀-Stufen im Vergleich zur Transformation nur mit pTLCas9 erzielt. Für den pTRCas9 wurde in dieser Arbeit eine Reduktion der Keimzahl von 2,7 log₁₀-Stufen bei Verwendung mit *Spacern* erreicht und dies ist somit nur eine Dekade geringer als für pTLCas9.

Beim Screening von jeweils zwölf Klonen der pTRKL2-Ansätze mit verschiedenen *Spacern* durch Sequenzierung konnten Guo et al. (2019) keine Mutation feststellen und schlossen somit auf größere *Off-Target*-Effekte. Bei der Transformation von pTHCas9 (pTRKH2 mit CRISPR-Cas9 Kasette) ohne Reparatur-Template erhielten Guo et al. (2019) eine bis zu 7fach reduzierte Anzahl an Transformanten für *galK*, *hemN* und *noxD* und eine 100 %ige Reduzierung der Transformanten für *recA*, bezogen auf die Transformation mit pTLCas9 und einem 20 bp *Spacer*. Für pTHCas9 untersuchten Guo et al. ebenfalls die verschiedenen Längen der *Spacer* auf den Einfluss der Gegenselektion und fanden heraus, dass 25 bp die optimale Länge ist und dadurch *Off-Target*-Effekte im Grunde genommen beseitigt werden. Dies entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit, bei der mit dem pTRCas9 und einem 25 bp *Spacer* die genannten 1,0; 2,0 und 8,0 KbE/100 ng Plasmid erzeugt wurden, da bei einer so geringen Anzahl ebenfalls von keinen *Off-Target*-Effekten ausgegangen werden kann. Die hohe Zielgenauigkeit

des CRISPR-Cas9 Systems bei Verwendung eines *high-copy* Plasmids konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden.

Bei der Untersuchung von *galKo* untersuchten Guo et al. (2019) zwölf Kolonien, von denen neun die Mutation enthielten, und kamen zu dem Ergebnis, dass pTHCas9galK eine Mutationsrate von 75 % hat. Dieses Ergebnis konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden, da ebenfalls eine Mutationsrate von 75 % bei Verwendung des *gal-Spacers* erreicht wurde.

Bezüglich der Unklarheit des verwendeten Replikationsursprungs von Guo et al. lässt sich festhalten, dass, falls bei Guo et al. (2019) der pWV01-Replikationsursprung verwendet wurde, das System ähnliche Werte bei Verwendung eines Vektors mit pSH71-Replikationsursprung erzielte und bei weiteren Versuchen ebenfalls analog verwendet werden kann.

Song et al. (2021) verwendeten ein CRISPR-Cas9 Einzel-Plasmid System, indem sie die CRISPR-Cas9 Kasette zusammen mit dem Reparatur-Template auf ein Plasmid klonierten. Von diesem Reparatur-Template-Teil wird mit einem starken konstitutiven Promotor P23 die sgRNA abgelesen. Mit den Homologen-Armen, aus denen die abgelesene sgRNA bestand, wurden, anders als bei Guo et al. (2019), bei denen keine Deletion von 150 bp funktioniert hatte, DNA-Fragmente in der Größe von 636 bp und 945 bp entfernt. Mit dem P23 Promotor erzielten Song et al. (2021) Mutationseffizienzen von 50 % und 16 %. Chen et al. (2021) verwendeten als Promotor den *bacA* Promotor, welchen sie vor das *cat*-Gen klonierten. Dieses lag auf dem dsDNA-Template. Es ist anzunehmen, dass die Gen-Editierung mit dem dsDNA-Template auf dem Vektor pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop nicht funktionierte, da kein starker Promotor vorgeschaltet war. In weiteren Versuchen zur dsDNA-Template Rekombination in *Lactococcus* spp. sollte ein zusätzlicher Promotor getestet werden, ob dadurch höhere Mutationseffizienzen erzeugt werden könnten. Interessanterweise konnten Chen et al. (2021) ein dsDNA-Template verwenden, welches sie durch PCR-Amplifikation erstellten und sich somit nicht auf einem Plasmid befand. Diese Technik sollte bei weiterer Forschung im Bereich dsDNA-Template Mutation bei *Lactococcus* spp. ebenfalls untersucht werden.

Da ein weiteres CRISPR-Cas9 System von Song et al. (2021) in *L. cremoris* NZ9000 etabliert wurde, liegt es nahe, dieses System für weitere Versuche in den Starterkulturstämmen zu verwenden. Bei Betrachtung des Rückgrats des pLL ist auffällig, dass es sich um den gleichen Replikationsursprung wie beim pTRCas9 handelt, den pAM β 1-Replikationsursprung. In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob dieses Plasmid sich in die Starterkulturstämme transformieren lässt. Es hat eine Größe von ca. 14 kb, mit dem dsDNA-Template und einem 100 bp Abschnitt, der für die gRNA kodiert (Song et al., 2021). Da mit 14 kb das Plasmid von Song et al. (2021) sogar noch größer als der pTRCas9 Vektor ist,

könnte damit überprüft werden, ob die Transformierbarkeit von pTRCas9 in die Stämme *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 aufgrund der Größe des Plasmids erfolglos bleibt.

Ein weiteres CRISPR-Cas9 Einzel-Plasmid-System beruht auf dem Rückgrat von pNZ8148 (pSH71-Replikationsursprung), bei dem zwei Nisin-Promotoren direkt hintereinander kloniert wurden und erst danach das *cas9*-Gen folgt (Berlec et al., 2018). Die Möglichkeit, die sgRNA zu klonieren, wurde direkt hinter der Transkriptionsstartstelle des ersten Nisin-Promotors über zwei Restriktionsschnittstellen erzeugt. Das pNZCRISPR Plasmid hat eine Gesamtgröße von 7460 bp. Bemerkenswert ist, dass die Autoren der genannten Studie ein aktives CRISPR-Cas System erstellen konnten, das wesentlich kleiner ist, als das in dieser Arbeit verwendete System. Außerdem liegt es auf einem Vektor mit pSH71-Replikationsursprung, obwohl pSH71-Replikons als Vektoren mit einer geringen Tragekapazität angesehen werden und daher geeigneter für die Klonierung kleiner Gene sind (Kazi et al., 2022). Das *cas9*-Gen, welches verwendet wurde, stammt von pVPL3004 (Oh & van Pijkeren, 2014), die dieses *cas9*-Gen ebenfalls vom Plasmid pCas9 (Addgene #42876) amplifiziert haben und es somit das gleiche Plasmid ist, welches in dieser Arbeit verwendet wurde.

Eine Option, dieses System zu verwenden, ist die Kombination von pNZ9530 mit pNZCRISPR von Berlec et al. (2018). Da die Transformation von pNZ9530 in *L. cremoris* LTH 7122 erfolgreich war, und hier eine Induzierung der Rekombinase auf pNZrecTPG gezeigt werden konnte, könnte dieses System mit pNZCRISPR kombiniert werden. Berlec et al. (2018) zeigen, dass sie ein aktives CRISPR-Cas9 System entwickelt haben, da sie weniger Kolonien bei Verwendung der sgRNA auf das Erythromycin-Gen des co-transformierten Plasmids im Vergleich zu den Kontrollansätzen erzeugten. In weiteren Arbeiten sollte untersucht werden, ob dieses System auch aktiv gegen native Plasmide ist. *L. cremoris* LTH 7122 pNZ9530 könnte mit pNZCRISPR, das eine sgRNA für das *prtP*-Gen trägt, transformiert werden. Es sollte mit Nisin induziert und damit das CRISPR-Cas9 System aktiviert werden, welches dann einen DSB im *prtP*-Gen erzeugen würde. Da bei Berlec et al. (2018) keine heterologe Rekombinase verwendet wurde, wäre bei diesem System keine Mutation über ein Reparatur-Template möglich. Die Autoren merken an, dass ihr System nicht für eine konstitutive Expression von Cas9 und somit auch nicht für Zielsequenzen auf dem Genom geeignet ist, da dies zum Zelltod führen würde. Bei ihren Versuchen zum *htrA*-Gen, welches chromosomal kodiert ist, konnten sie eine Verringerung der Wachstumsrate im Vergleich zur Nicht-Induzierung beobachten. Eine ähnliche Beobachtung machten van der Els et al. (2018), die als Zielsequenz das *pepN*-Gen im *L. cremoris* MG1363 untersuchten und eine 10⁵-fache Reduktion der Transformanten im Vergleich zur Transformation der Zellen mit einem leeren Vektor beobachteten. Hierbei wurde jedoch ein konstitutiver Promotor vor dem *cas9*-Gen verwendet. Van der Els et al. (2018) merken an, dass der induzierte DSB von Cas9 im Chromosom von *Lactococcus* spp.

hochgradig letal ist, bei integrativen Plasmiden jedoch als Gegenselektions-Werkzeug genutzt werden kann. Die Autoren verwendeten das System ebenfalls, um das Chloramphenicol-Resistenzgen auf pNZ8048 in *L. cremoris* NZ900 auszuschalten. Dies führt zu einem Verlust des Plasmids. Da pNZ8048 Vektor ein *high-copy* Plasmid ist, lassen sich durch Cas9 effektiv Plasmide mit hoher Kopienzahl entfernen. Berlec et al. (2018) kamen zu demselben Ergebnis, dass bei Verwendung einer Zielsequenz, die auf einem Plasmid liegt, es zu dessen Entfernung oder zum Verlust des Plasmids führt. Garay-Novillo et al. (2024) konnten durch Verwendung eines pH-regulierten CRISPR-Cas9 Vektors den Verlust von zuvor transformierten Plasmiden in *L. cremoris* MG1363 erzeugen. Eine Elimination von ganzen Plasmiden mittels CRISPR-Cas9 untersuchten auch Cao et al. (2017) *in vivo* in *Zymomonas mobilis*, jedoch hatten sie als Zielsequenz das Replikations-Gen der endogenen Plasmide des Organismus gewählt, so dass es zu einer kompletten Elimination der Plasmide kam. Eine Elimination des PrtP-Plasmids der Starterkulturstämme würde jedoch zum Verlust wichtiger Funktionen des Wirtes im Milch-Medium führen und somit vermutlich zum Zelltod. Insofern wäre eine solche Untersuchung hinsichtlich der Entstehung von Bitterpeptiden wahrscheinlich von weniger Wert.

In einer Studie, die ebenfalls ein Integrations-Plasmid nutzte, wurde dieses für das PrtP-Plasmid als Zielsequenz verwendet: Radziwill-Bienkowska et al. (2017) erstellten für den Stamm *L. cremoris* IBB477 eine *prtP-Knockout* Variante, indem ein größeres Stück des *prtP*-Gens des Stamms durch Verwendung einer Schnittstelle und vier Primern amplifiziert und anschließend auf pGhost9 kloniert wurde. Dieser Vektor wurde danach in *L. cremoris* IBB477 transformiert. Der pGhost9 Vektor ist ein temperatursensitiver Vektor, der sich als Integrations-Exzisionssystem nutzen lässt (Maguin et al., 1996). Interessanterweise ist dies auch für Plasmid-kodierende Gene möglich, obwohl das System der pGhost-Vektoren zunächst nur für chromosomale DNA von *Lactococcus* spp. getestet wurde. Als Bedingung wurde festgestellt, dass das Plasmid, welches sich integrieren soll, auf einem RCR-Mechanismus beruhen muss (Biswas et al., 1993). Radziwill-Bienkowska et al. (2017) waren somit die ersten, die als Zielgen in *L. cremoris* ein Plasmid kodiertes Gen eines endogenen Plasmids verwendet hatten, da bei van der Els et al. (2018) und Berlec et al. (2018) heterologe Plasmide als Zielsequenz verwendet wurden. Die pG⁺host Plasmide, zu denen auch der pGhost9 zählt, beruhen auf dem pWV01-Replikationsursprung (Maguin et al., 1996) und sind somit theoretisch in *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH7123 transformierbar. Jedoch ist die Verwendung des pGhost9 mit einem hohen Screening Aufwand verbunden, um schlussendlich die Wildtyp-Zellen, die das Plasmid erfolgreich ausgeschnitten haben, von den Mutanten, die das Plasmid ebenfalls erfolgreich ausgeschnitten haben und dazu die Mutation besitzen, zu unterscheiden. In weiterer Forschung sollte untersucht werden, ob mit dem pGhost-Vektor Punktmutationen im *prtP*-Gen möglich sind und hier eine Gegenselektion mit CRISPR-Cas9 erzeugbar wäre.

Berlec et al. (2018) untersuchten ebenfalls die Repression der Transkription. Hierbei ersetzten sie das *cas9*-Gen auf pNZCRISPR durch ein *dCas9*-Gen und erhielten pNZCRISPRi, mit dem ein CRISPR-dCas9 System exprimiert werden kann und dies zur Stilllegung einzelner Gene führen kann. Für das *upp*-Gen wendeten sie eine pNZCRISPRi Variante an, die die Zellen vor der Toxizität von 5-Fluorouracil schützt. In zukünftigen Untersuchungen sollte erforscht werden, ob eine pNZCRISPRi Variante, die auf das *prtP*-Gen abzielt, eventuell ähnliches Verhalten bezüglich des Kasein Abbaus zeigt. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass dCas9 nur einen bestimmten Zell-Zyklus und vermutlich nur unter Induzierung eines Promotors konstant bindet. Huang et al. (2025) konnten zeigen, dass die Expression von dCas9 von einem Plasmid-System aus in *L. cremoris* NZ9000 zu einer nicht durchgängigen Expression führt und phänotypische Mutanten auch ohne Induzierung erzeugt. Es bleibt fraglich, ob die Expression von dCas9 ausreicht, um eine Stilllegung von *prtP* zu erzeugen, da jegliche Kopien des *PrtP*-Plasmids innerhalb eines bestimmten Zell-Zyklus stilgelegt werden müssten. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es nur eine geringe Kopienzahl gibt, da für das *PrtP*-Plasmid pLP712 eine Kopienzahl von zwei bestimmt wurde (Tarazanova et al., 2016).

8.4 ssDNA-Rekombination in Milchsäurebakterien im Vergleich zu den Starterkulturstämmen

Thomason et al. (2014) beschreiben, dass sich die alleinige Verwendung von RecT nur zur ssDNA Rekombination eignet. Chen et al. (2021) hingegen verwendeten eine Rekombinase aus *E. faecium*, um eine dsDNA Rekombination in *Enterococcus* spp. zu erhalten. Sie transformierten über eine dsDNA Vorlage das Chloramphenicol-Gen. Jedoch benötigt die dsDNA Rekombination die Insertion eines Antibiotika Selektionsmarkers und kann zu Mutationseffekten führen, indem es die Transkription nachgeschalteter Gene oder Operons an der Stelle, an die das Antibiotikaresistenzgen kloniert wird, beeinflusst (Chen et al., 2021). Dies könnte der Grund sein, wieso die Rekombination mit dem doppelsträngigen DNA-Template bei den Starterkulturstämmen aus dieser Arbeit nicht gelang. Die Rekombination durch eine Rekombinase aus *E. faecium* und Verwendung eines dsDNA-Templates zum *Knock-out* von *codY* in *L. cremoris* NZ9000 führte bei einer anderen Arbeit, die im Rahmen dieses Forschungsprojekts erstellt wurde, nicht zum Erfolg (Saf, 2024).

Van Pijkeren et al. (2012) untersuchten die relative Aktivität von RecT Homologen von verschiedenen LAB im Vergleich zu der Rekombinase RecT aus *LI. reuteri* ATCC PTA 6475 und fanden heraus, dass RecT von *E. faecalis* CRMEN 19 die höchste relative Aktivität mit 76 % aufweist. Demzufolge ist davon auszugehen, dass Rekombinasen aus *E. faecalis* für Rekombinationsexperimente in Milchsäurebakterien geeignet sind. Daher müsste die in dieser Arbeit verwendete Rekombinase, welche ebenfalls aus einem *E. faecalis* Stamm stammt und von Guo et al. (2019) schon in *L. cremoris* NZ9000 verwendet wurde, auch eine Aktivität in

den Starterkulturen zeigen. Die Expression der in dieser Arbeit verwendeten Rekombinase konnte für *L. cremoris* LTH 7122 mittels SDS-PAGE bereits bestätigt werden (Schuster, 2025b).

Eine erfolgreiche Rekombination mittels RecT und Einbau einer Mutation lässt sich mittels MAMA-PCR in rekombinanten Zellen detektieren. Dieses Assay beruht darauf, dass ein Amplifikat durch den Mutagenese-Primer mit dem Wildtyp-Primer und ein Amplifikat aus zwei Wildtyp-Primern entstehen. Van Pijkeren & Britton (2012) erhielten für die ssDNA-Rekombination mittels RecT und anschließende Detektion über MAMA-PCR für *LI. reuteri* und *L. lactis* eine Effizienz von 0,4–19 %. Die ssDNA Mutation und Detektion in *L. cremoris* MG1363 zeigte 1 % Effizienz (van Pijkeren & Britton, 2012). Da die Rekombinationseffizienz dieses Verfahrens so gering ist, wurden in dieser Arbeit von einem Ansatz bis zu 115 Kolonien gescreent, um nicht aufgrund des geringen Screeningumfangs keinen positiven Klon zu erhalten. Es ist jedoch festzuhalten, dass diese Mutationseffizienzen im Vergleich zu CRISPR-Cas9 Experimenten sehr gering sind, bei denen in dieser Arbeit und auch in der Literatur Mutationseffizienzen von bis zu 75 % erreicht werden konnten (Guo et al., 2019).

Van Pijkeren & Britton (2012) konnten für *LI. reuteri* eine lineare Korrelation zwischen Erhöhung der Oligo-Konzentration bis 100 µg und der Anzahl an Rifampicin-resistenten Kolonien ermitteln, daher wurden in dieser Arbeit ebenfalls neben einer Menge von 10 µg auch eine Menge von 100 µg Reparatur-Template verwendet, um zu analysieren, ob sich diese Korrelation auf *L. cremoris* und *L. lactis* Stämme übertragen lässt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass eine Erhöhung der Reparatur-Template-Menge keine Auswirkungen auf die Mutationseffizienz hat. Dies lag wohlmöglich an der Nicht-Induzierbarkeit der Starterkulturstämme durch Xylose.

Außerdem untersuchten van Pijkeren & Britton (2012) die Co-Aufnahme von zwei Oligo-Nukleotiden, indem sie Rifampicin-resistente Kolonien durch eine Punktmutation des *rpoB*-Genes erzeugten und eine weitere Mutation des *malG*-Gens hervorrufen wollten. Sie erhielten eine Mutationseffizienz des *malG* von 2 %. Die Verwendung von *rpoB* als Kontrolle, ob das RecT/ssDNA Rekombinationssystem funktioniert, sollte auch bei den Starterkulturstämmen untersucht werden. Im gleichen Zuge sollte dann erneut überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen der Reparatur-Template-Menge und der Mutationseffizienz für die Stämme feststellbar ist.

Zur optimalen Verwendung der ssDNA Rekombinationstechnik ist zu beachten, dass das Oligonukleotid identisch mit dem Folgestrang sein muss, der als Okazaki-Fragment diskontinuierlich repliziert wird. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass während der Synthese des Folgestrangs viel mehr einzelsträngige DNA als Vorlage für die Bindung verfügbar ist, als bei der kontinuierlichen Synthese des Leitstrangs. Obwohl nicht sicher ist,

wie Oligonukleotide in das Chromosom eingebaut werden, ist es möglich, dass sie entweder als Primer für die Okazaki-Fragment-Synthese dienen oder dass sie in die DNA ligiert werden, als würden sie als Okazaki-Fragment erkannt (van Pijkeren & Britton, 2014). Daher ist wahrscheinlich, dass die alleinige Verwendung der ssDNA Rekombinationstechnik nur bei Genen eingesetzt werden kann, die über ein Okazaki-Fragment repariert oder repliziert werden und daher optimal für chromosomale Gene geeignet ist.

Interessanterweise konnten Yu et al. (2000b) eine dsDNA-Rekombination auch auf einem Plasmid in *E. coli* durchführen. Hierbei induzierten die Autoren das Lambda-System der Wirtszellen. Yu et al. (2000b) konnten feststellen, dass bei Deletion von *exo*, *bet* oder *gam* dieses einen großen Effekt auf die Zielgen-Rekombination hatte und andere Gene des Operons nur einen leichten oder keinen Effekt hatten. Da bei diesem Versuch das Lambda-System der Wirtszelle induziert wurde, ist diese Anwendung in *Lactococcus* spp. eventuell nur unter heterologer Rekombination möglich. Bei weiterer Forschung in den beiden Starterkulturstämmen *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 sollte die ssDNA-Rekombinations-Technik nur für Mutationen der chromosomal kodierten proteolytischen Gene eingesetzt werden. Wie in der Arbeit von Schuster (2025b) gezeigt wurde, ist eine Nisin-Induzierung von *L. cremoris* LTH 7122 durch Plasmid-kodierte *nisRK*-Gene möglich, sodass eine Nisin-Induzierung von RecT zur ssDNA Rekombination erfolgen kann.

Da eine Nisin-Induzierung in *L. cremoris* LTH 7122 mit einer Kombination von pNZ9530 und pNZrecTPG möglich ist, könnte hier erneut eine Mutation der Starterkulturstämme untersucht werden. Jedoch ist zu beachten, dass allein durch die Rekombinase RecT mit Reparatur-Template wohlmöglich keine Mutation auf einem Plasmid kodierten Gen möglich sein wird. Dies liegt vermutlich an den Replikationsmechanismen, durch die die Plasmide vermehrt werden. Wenn es sich um ein RCR-Plasmid handelt, wird der parentale Strang als Vorlage verwendet und das Ablesen beginnt direkt hinter dem *dso* (del Solar et al., 1998). Es ist fraglich, wie hierbei stattdessen ein Reparatur-Template aus nur 100 bp oder weniger als Vorlage eingesetzt werden könnte. Somit ist eine Verdrängung bei fortlaufender Synthese höchst unwahrscheinlich. Die Rekombinase RecT schützt ein ssDNA Reparatur-Template vor dem Abbau der zelleigenen Nukleasen und hilft bei der Stabilisation, wenn sich dieses an die Replikationsgabel anlagert (Ellis et al., 2001). Es ist vorstellbar, dass die Lokalisation des Zielgens auf einem Theta-Replizierenden Plasmid von Vorteil ist. Hier ist die Anlagerung einer ssDNA wahrscheinlicher als auf einem RCR-Plasmid, da dort die Öffnung der dsDNA zu einem D-Loop erfolgt. Außerdem ist die Replikation bei RCR-Plasmiden ab dem *sso* auf dem parentalen Plusstrang orientierungsabhängig (del Solar et al., 1998), sodass eine Anlagerung eines ssDNA Reparatur-Templates als unwahrscheinlich angesehen werden muss. Bei pLP712, welches das *prtP*-Gen in NCDO712 kodiert hat, handelt es sich um ein Theta-

replizierendes Plasmid (Tarazanova et al., 2016). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die PrtP-Plasmide der beiden Starterkulturstämme aufgrund ihrer Größe und der Ergebnisse aus der Literatur ebenfalls über den Theta-Mechanismus repliziert werden. Somit scheint die ssDNA-Rekombination des *prtP*-Gens bei Nisin-Induzierung vielversprechend zu sein.

Die Ergebnisse von Rudolph (2025) zeigen, dass eine Transformation von pMSP3535VA, welcher das *recT*-Gen trägt, in die Stämme *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 möglich ist. Jedoch konnte keine erhöhte Expression der Rekombinase mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. In weiterer Forschung sollte untersucht werden, ob der pMSP3535VA sich generell nicht für die Nutzung in den Starterkulturstämmen eignet, oder ob nur der Replikationsursprung VA380-Rep ausgetauscht werden müsste und dann eine Expression der *nisRK*-Gene sowie einer Rekombinase vor einen Nisin-Promotor auf demselben Plasmid möglich wäre, um so eine ssDNA-Rekombinationstechnik in den Starterkulturstämmen anwenden zu können.

8.5 Xylose-Induzierung bei *Lactococcus* spp.

Die Ergebnisse der MAMA-PCR sowie der Sequenzierung zeigten kein positives Ergebnis bezüglich der Mutation. Um auszuschließen, dass dies an dem rekombinanten Plasmid pNZrecTGV lag, und hier die Rekombinase nicht richtig abgelesen wurde, wurde die Expression der Rekombinase mittels Xylose Promotor mit einer SDS-PAGE überprüft.

In der Studie von Miyoshi et al. (2004) wurde ein System zur Xylose-Induzierung in *L. lactis* NCDO 2118 entworfen. Hierbei wurde das Sekretionsprotein Usp45 mit dem Xylose Promotor exprimiert und quantitativ über Coomassie-Blau detektiert, um eine extrazelluläre Expression nachzuweisen. In einem zweiten Teil wurde das *nuc*-Gen hinter den Xylose Promotor kloniert, sodass das exprimierte Protein im Cytoplasma verblieb. Das entworfene System wurde dann in *L. lactis* NCDO 2118 transformiert (Miyoshi et al., 2004). Die Autoren untersuchten induzierte Zellen in der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ 0,4) und in der stationären Phase (OD₆₀₀ 1,5). In beiden Phasen konnte festgestellt werden, dass Nuc exprimiert wird. Außerdem zeigte sich für die Kombination mit dem Sekretionsprotein Usp45, dass die Proteinkonzentration von Zellen aus der stationären Phase vier- bis fünfmal höher war als von Zellen aus der exponentiellen Phase. In einem weiteren Versuch untersuchten die Autoren das Verhalten von *L. lactis* IL 1403 und *L. cremoris* MG1363 auf die Xylose-Induzierung, indem sie die beiden Plasmide zur Sekretion und Verbleib im Cytoplasma in die Stämme transformierten. Sie stellten fest, dass bei einer ÜK ein maximaler OD₆₀₀ von 0,6 für *L. lactis* IL1403 und von 1,5 für *L. cremoris* MG1363 erreicht werden konnte. Die Nuc-phänotypischen Kolonien der beiden Stämme wurden analysiert, indem die Nuc-Aktivität wie bereits für *L. lactis* NCDO 2118 gemessen wurde. Es konnte keine Nuc-Aktivität festgestellt werden. Ein weiteres Western-Blot

Experiment, bei dem anti-Nuc-Antikörper verwendet wurden, bestätigte, dass diese Stämme nicht für die Xylose-Induzierung geeignet sind. Dies bestätigt das Ergebnis der SDS-PAGE des *L. cremoris* NZ9000, welcher ein Abkömmling von *L. cremoris* MG1363 ist, zur Xylose-Induzierung, da hier ebenfalls keine erhöhte Expression der Rekombinase gezeigt werden konnte. Miyoshi et al. (2004) kommen zu der Schlussfolgerung, dass die beiden untersuchten Stämme keine Xylose verstoffwechseln können. Die Autoren merken an, dass sich dies nicht auf alle *Lactococcus* Stämme, welche Kohlenhydrate verstoffwechseln können, übertragen lässt. Die beiden Stämme *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 sind eng verwandt mit den beiden untersuchten Stämmen aus dem Paper von Miyoshi et al. (2004): *L. cremoris* MG1363 ist der Referenzstamm für *L. cremoris* LTH 7122 und somit lässt sich erklären, wieso *L. cremoris* LTH 7122 ähnlich auf Xylose reagiert wie *L. cremoris* MG1363. Auch *L. lactis* LTH 7123 ist phylogenetisch nahe zu *L. lactis* IL1403, sodass ein ähnliches Verhalten erklärbar ist. In einer weiteren Studie wurde ebenfalls *L. lactis* NCDO 2118 verwendet, um den Xylose Promotor zu nutzen (Carvalho et al., 2016). Bei Santos et al. (2021) wurde ein Xylose Promotor in Kombination mit einem CRISPR-Cas9 Plasmid verwendet und es konnte eine Induzierung durch Wachstum über Nacht erreicht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass weder eine Einstellung auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,1 noch ein Wachstum bis in die stationäre Phase (wie bei einer ÜK) zu einer Induzierung mittels Xylose führt. Die Autoren untersuchten den Stamm *L. lactis* LMG 19460, der eine Plasmid-freie Variante von *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis Bu2 ist, welcher aus einer Starterkultur aus der Käseherstellung isoliert wurde (Silva et al., 2017). Dieses Ergebnis ist gegensätzlich zu Miyoshi et al. (2004), die keine Induzierung bei milchassoziierten Stämmen aufzeigen konnten. Die Ergebnisse von Santos et al. (2021) sind jedoch kritisch zu hinterfragen, da diese noch nicht in einem *Peer-reviewed* Journal veröffentlicht wurden. Daher wurde die Studie von Santos et al. (2021) in dieser Arbeit nur zum Entwurf der Methode zur Xylose-Induzierung verwendet.

Zur Xylose induzierten Genexpression in milchassoziierten Stämmen liegen folgende Erkenntnisse vor: Die Autoren der Review-Artikel Cho et al. (2020) und Kazi et al. (2022) weisen darauf hin, dass in der Studie von de Azevedo et al. (2012) der Vektor pValac mit dem Promotor PxyIT im *L. cremoris* NZ9000 verwendet wurde. Jedoch ist in der Literatur zum pValac beschrieben, dass dieser den eukaryotischen Expression-Promotor pCMV trägt und nur den prokaryotischen Teil von pXylT:CVT als Rückgrat hat, der die Replikationsproteine RepA und RepC enthält (Guimarães et al., 2009). Auch wird in der Studie von de Azevedo et al. (2012) nicht mit Xylose induziert, sodass dies bestätigt, dass hier vermutlich kein Xylose Promotor in *L. cremoris* NZ9000 verwendet wurde. Dies unterstreicht ebenfalls das Ergebnis der SDS-PAGE dieser Arbeit, die keine Induzierbarkeit des Xylose Promotors im *L. cremoris* NZ9000 anzeigte. Die SDS-PAGE Überprüfung in dieser Arbeit wurde erst nach den

Versuchen zur MAMA-PCR durchgeführt, da zunächst von einer grundlegenden Funktion des Systems in den Starterkulturstämmen ausgegangen wurde und mit der SDS-PAGE im *L. cremoris* NZ9000 nur die allgemeine Funktion des Vektor-Konstrukts bestätigt werden sollte. Zur Überprüfung, ob pNZrecTGV in seiner Funktion vollständig ist, sollte in weiteren Forschungsprojekten eine Transformation in *L. lactis* NCDO 2118 vorgenommen werden. Unter Einbeziehung der Literatur und den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ist eine Induzierung mittels Xylose in *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123 nicht möglich.

8.6 Mutation von Genen des proteolytischen Systems zur Reduktion von Bitterpeptiden

Die Ergebnisse des Screenings der Starterkulturstämme zeigen, dass keine Mutation des *prtP*-Gens dieser Stämme unter den in dieser Arbeit verwendeten Methoden möglich ist. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von *L. cremoris* NZ9000 zu *L. cremoris* LTH 7122 kann das unterschiedliche Fermentationsverhalten in Milchprodukten und die Entstehung von Bitterpeptiden womöglich besser in diesem Stamm untersucht werden. Wie bei Siezen et al. (1993) sollte eine Variante von pNZ8048 mit dem *prtP*-Gen in *L. cremoris* NZ9000 kloniert werden. Durch verschiedene Mutationen des PrtPs sollte geprüft werden, ob bei Fermentation im Milchmedium Bitterpeptide erzeugt werden können. Siezen et al. (1993) konnten zeigen, dass das Bakterium bei Veränderung von Serin in der katalytischen Triade zu Alanin in Milch nicht mehr wächst und somit von einer Inaktivität des Enzyms ausgegangen werden kann. Sebald et al. (2018) konnten die Aminosäuresequenz einiger Bitterpeptide identifizieren, sodass diese bei zukünftigen Versuchen synthetisiert und gezielt ins Medium gegeben werden können. In weiteren Forschungsarbeiten könnte untersucht werden, ob bei Verwendung eines Stammes mit inaktivem PrtP und Zugabe der Bitterpeptide ins Medium die Bitterkeit des Produktes gesenkt werden kann, da die Bitterpeptide in die Zelle aufgenommen werden. Bei Zugabe der Bitterpeptide und Di- und Tripeptide bei inaktivem PrtP könnte untersucht werden, ob die Di- und Tripeptide vermehrt in die Zelle aufgenommen werden. Siezen et al. (1993) untersuchten nur PrtP und keine weiteren Proteine des proteolytischen Systems, sodass es wichtig wäre, die Peptidtransporter und intrazellulären Proteinasen ebenfalls zu untersuchen.

Bei weiterer Forschung mit einer mutierten Proteinase PrtP sollte beachtet werden, dass Hansen & Marcatili (2020) die Beobachtung gemacht haben, dass PrtP vermutlich hinsichtlich der Spaltstelle im Substrat nicht selektiv, aber hinsichtlich der Länge oder Beschaffenheit des Substrats selektiv ist. Beispielsweise ist davon auszugehen, dass eine Verengung am katalytischen Spalt als Druckknopf genutzt wird, sodass kurze Peptide nicht übermäßig abgebaut werden und lange Peptide an mehreren Stellen gespalten werden können (Hansen & Marcatili, 2020). Somit ist eine Veränderung des Bitterpeptidgehalts aufgrund von selektiver Zugabe von Proteinen unwahrscheinlich. Vermutlich werden längere Peptide in kurzketten-

Bitterpeptide abgebaut, da insbesondere kurzkettige Peptide (<20 Aminosäurereste) als bitter wahrgenommen werden (Sebald et al., 2018).

Die Forschungsergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen, dass eine Mutation von der CodY-Bindestelle sowie des *codY*-Gens im *L. cremoris* NZ900 zu keinem veränderten Wachstum in MC-Boullion führt. Vermutlich werden ausreichend Peptide über die anderen Transporter des proteolytischen Systems in die Zelle aufgenommen, sodass keine Wachstumsverminderung stattfindet. Guédon et al. (2001) konnten zeigen, dass bei Zugabe von Kasein-Hydrolysat, bestehend aus 80 % Peptiden und 20 % freien Aminosäuren ins Wachstumsmedium die Expression von sechs Transkriptionseinheiten, darunter *prtP*, *prtM*, *opp-pepO1*, *pepD*, *pepN*, *pepC* und *pepX*, 5 bis 150-fach unterdrückt wurde. Daher wäre bei zukünftigen Forschungsvorhaben sinnvoll, die weiteren Transporter ebenfalls zu mutieren und anschließend den Bitterpeptidgehalt im Medium zu messen, um zu prüfen, ob die Bitterpeptide durch die Spaltung des PrtP oder durch Milch-eigene Enzyme entstehen. In weiteren Untersuchungen sollte verifiziert werden, ob *L. cremoris* NZ9000, der Mutationen der chromosomal kodierten Gene des proteolytischen System trägt, zur Entwicklung von Bitterpeptiden beiträgt. In diese Mutante sollte plasmidkodiertes heterologes PrtP (ohne Mutation) transformiert werden, um Rückschlüsse auf die Bedeutung von PrtP bei der Entstehung von Bitterpeptiden ziehen zu können.

8.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen einen Grundstein zur weiteren Forschung von Starterkulturstämmen. Es konnte gezeigt werden, dass sich bislang wenig charakterisierte Starterkulturstämme in ihrem Verhalten deutlich von etablierten, bereits intensiv erforschten Stämmen unterscheiden. Weitere Forschung zur gezielten genetischen Modifikation dieser Stämme ist daher erforderlich, um ihren Einfluss auf die Bildung von Bitterpeptiden während der Fermentation von High-Protein-Produkten besser zu verstehen. Ein vertieftes Verständnis dieser Zusammenhänge ist von besonderer Bedeutung, da die gezielte Optimierung von Starterkulturstämmen zur Reduktion von Sauermolke bei der Fermentation und somit zu weniger Abfällen in der Herstellung von Milchprodukten führt. Des Weiteren sollte die entwickelte CRISPR-Cas9 Technik im *L. cremoris* NZ9000 dazu genutzt werden, weitere Fermentationsversuche mit diesem Stamm durchzuführen, um Erkenntnisse hinsichtlich der Verwendung klassischer Starterkulturstämme zu gewinnen.

9 Literaturverzeichnis

- Al-Allaf, F. A., Tolmachov, O. E., Zambetti, L. P., Tchetchelnitski, V., & Mehmet, H. (2012). Remarkable stability of an instability-prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* Stbl3. *3 Biotech*, 3(1), 61–70. <https://doi.org/10.1007/S13205-012-0070-8>
- Alegre, M. T., Rodríguez, M. C., & Mesas, J. M. (2004). Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with in vitro modified plasmid DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 241(1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.006>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ammann, A., Neve, H., Geis, A., & Heller, K. J. (2008). Plasmid transfer via transduction from *Streptococcus thermophilus* to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 3083–3087. <https://doi.org/10.1128/jb.01448-07>
- Berlec, A., Škrlec, K., Kocjan, J., Olenic, M., & Štrukelj, B. (2018). Single plasmid systems for inducible dual protein expression and for CRISPR-Cas9/CRISPRi gene regulation in lactic acid bacterium *Lactococcus lactis*. *Scientific Reports*, 8, Article 1009. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19402-1>
- Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3628–3635. <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3628-3635.1993>
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*, 11(5), 731–753. <https://doi.org/10.1101/169701>
- Broadbent, J. R., Strickland, M., Weimer, B. C., Johnson, M. E., & Steele, J. L. (1998). Peptide accumulation and bitterness in Cheddar cheese made using single-strain *Lactococcus lactis* starters with distinct proteinase specificities. *Journal of Dairy Science*, 81(2), 327–337. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75581-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75581-X)
- Bryan, E. M., Bae, T., Kleerebezem, M., & Dunny, G. M. (2000). Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid*, 44(2), 183–190. <https://doi.org/10.1006/plas.2000.1484>
- Cao, Q. H., Shao, H. H., Qiu, H., Li, T., Zhang, Y. Z., & Tan, X. M. (2017). Using the CRISPR/Cas9 system to eliminate native plasmids of *Zymomonas mobilis* ZM4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(3), 453–459. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1189312>
- Carvalho, R., Morais, K., Bastos Pereira, V., Gomes Santos, A. C., Diniz Luerce, T., de Azevedo, M., Santos Rochat, C., Severiano de Sousa, C., Prósperi, C., Carmona Cara, D., Caetano Faria, A. M., Bermudez-Humaran, L., Blottiere, H., Langella, P., de Moreno, M. A., Pereira Figueiredo, H. C., Leblanc, J. G. J., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2016). Oral administration of *Lactococcus lactis* expressing recombinant 15-lipoxygenase-1 (15 LOX-1) modulates chemically induced colitis in mice. *Medical Research Archives*, 4(7). <https://doi.org/10.18103/mra.v4i7.612>
- Chandrapala, J., Duke, M. C., Gray, S. R., Zisu, B., Weeks, M., Palmer, M., & Vasiljevic, T. (2015). Properties of acid whey as a function of pH and temperature. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4352–4363. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9435>
- Charneco, G. O., Kelleher, P., Buivydas, A., Streekstra, H., van Themaat, E. V. L., de Waal, P. P., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2021). Genetic Dissection of a Prevalent Plasmid-

- Encoded Conjugation System in *Lactococcus lactis*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.680920>
- Chen, V., Griffin, M. E., Maguin, P., Varble, A., & Hanga, H. C. (2021). RecT recombinase expression enables efficient gene editing in *Enterococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(18), 1–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-21>
- Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Astals, P., Echevarría, J., Iglesias, J. R., Balbarie, P., Ramón, D., & Genovés, S. (2011). Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1335–1343. <https://doi.org/10.1128/AEM.01820-10>
- Cho, S. W., Yim, J., & Seo, S. W. (2020). Engineering tools for the development of recombinant lactic acid bacteria. *Biotechnology Journal*, 15(6). <https://doi.org/10.1002/biot.201900344>
- Chopin, A. (1993). Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1–3), 21–37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00011.x>
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., & Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 217–246. <https://doi.org/10.1023/A:1002001919720>
- Concordet, J.-P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Costantino, N., & Court, D. L. (2003). Enhanced levels of λ Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15748–15753. <https://doi.org/10.1073/pnas.2434959100>
- Cui, Y., Hu, T., Qu, X., Zhang, L., Ding, Z., & Dong, A. (2015). Plasmids from food lactic acid bacteria: Diversity, similarity, and new developments. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13172–13202. <https://doi.org/10.3390/ijms160613172>
- de Azevedo, M., Karczewski, J., Lefèvre, F., Azevedo, V., Miyoshi, A., Wells, J. M., Langella, P., & Chatel, J.-M. (2012). In vitro and in vivo characterization of DNA delivery using recombinant *Lactococcus lactis* expressing a mutated form of *L. monocytogenes* Internalin A. *BMC Microbiology*, 12, Article 299. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-299>
- de Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2009). Volume 3: The *Firmicutes*. In W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., pp. 711–722). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Dehio, C., & Meyer, M. (1997). Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(2), 538–540. <https://doi.org/10.1128/jb.179.2.538-540.1997>
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejás, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 434–464. <https://doi.org/10.1128/membr.62.2.434-464.1998>
- Den Hengst, C. D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O. P., & Kok, J. (2005). Probing direct interactions between CodY and the oppD promoter of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 187(2), 512–521. <https://doi.org/10.1128/jb.187.2.512-521.2005>

- Den Hengst, C. D., van Hijum, S. A. F. T., Geurts, J. M. W., Nauta, A., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2005). The *Lactococcus lactis* CodY regulon: Identification of a conserved cis-regulatory element. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34332–34342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502349200>
- Dominguez, W., & O'Sullivan, D. J. (2013). Developing an efficient and reproducible conjugation-based gene transfer system for bifidobacteria. *Microbiology*, 159(2), 328–338. <https://doi.org/10.1099/mic.0.061408-0>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Duarte, S. O. D., & Monteiro, G. A. (2021). Plasmid replicons for the production of pharmaceutical-grade pDNA, proteins and antigens by *Lactococcus lactis* cell factories. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), Article 1379. <https://doi.org/10.3390/ijms22031379>
- Ellis, H. M., Yu, D., DiTizio, T., & Court, D. L. (2001). High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6742–6746. <https://doi.org/10.1073/pnas.121164898>
- Émond, É., Lavallée, R. L., Drolet, G., Moineau, S., & Lapointe, G. (2001). Molecular characterization of a theta replication plasmid and its use for development of a two-component food-grade cloning system for *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1700–1709. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1700-1709.2001>
- Eppendorf AG. (2001). *Lactococcus lactis* transformation protocol. Protocol No. 4308 915.519
- Exterkate, F. A., & Alting, A. C. (1999). Role of calcium in activity and stability of the *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1390–1396. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.4.1390-1396.1999>
- Exterkate, F. A., Alting, A. C., & Bruinenberg, P. G. (1993). Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3640–3647. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.11.3640-3647.1993>
- Foley, S., Daly, C., & Fitzgerald, G. F. (1993). Incompatibility properties of the narrow-host-range lactococcal plasmid pCI305. *Journal of General Microbiology*, 139(6), 1271–1276. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-6-1271>
- Forler, B., Horstmann, G., Schäfer, J., Michel, C., Weiss, A., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., & Schmidt, H. (2021). Effects of protein, calcium, and pH on gene transcription, cell-envelope peptidase activity of *Lactococcus lactis* strains, and the formation of bitter peptides. *Foods*, 10(7), Article 1588. <https://doi.org/10.3390/foods10071588>
- Garay-Novillo, J. N., Ruiz-Masó, J. Á., del Solar, G., & Barra, J. L. (2024). Easy-curing and pH-regulated CRISPR-Cas9 plasmids for gene editing and plasmid curing in *Lactococcus cremoris*. *Microbial Biotechnology*, 17(12). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70060>
- Gasson, M. J., Godon, J. J., Pillidge, C. J., Eaton, T. J., Jury, K., & Shearman, C. A. (1995). Characterization and exploitation of conjugation in *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*, 5(8), 757–762. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00030-5](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00030-5)
- Gibson, E. M., Chace, N. M., London, S. B., & London, J. (1979). Transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance from streptococci to lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 137(1), 614–619. <https://doi.org/10.1128/jb.137.1.614-619.1979>
- Grant, G. N., Jessee, J., Bloom, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4645–4649. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4645>
- Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, S. D., & Delorme, C. (2001). Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3614–3622. <https://doi.org/10.1128/jb.183.12.3614-3622.2001>
- Guédon, E., Serror, P., Ehrlich, S. D., Renault, P., & Delorme, C. (2001). Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 40(5), 1227–1239. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02470.x>
- Guimarães, V., Innocentin, S., Chatel, J.-M., Lefèvre, F., Langella, P., Azevedo, V., & Miyoshi, A. (2009). A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genetic Vaccines and Therapy*, 7, Article 4. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-7-4>
- Guo, T., Xin, Y., Zhang, Y., Gu, X., & Kong, J. (2019). A rapid and versatile tool for genomic engineering in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories*, 18, Article 22. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1075-3>
- Hansen, E. B., & Marcatili, P. (2020). Modeled structure of the cell envelope proteinase of *Lactococcus lactis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, Article 613986. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.613986>
- Holo, H., & Nes, I. F. (1989). High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris grown with glycine in osmotically stabilized media. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), 3119–3123. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.12.3119-3123.1989>
- Huang, C., Liu, M., & Kok, J. (2025). Chromosomal and plasmid-based CRISPRi platforms for conditional gene silencing in *Lactococcus lactis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 26, Article 9516. <https://doi.org/10.3390/ijms26199516>
- Huang, H., Song, X., & Yang, S. (2019). Development of a RecE/T-assisted CRISPR–Cas9 toolbox for *Lactobacillus*. *Biotechnology Journal*, 14(7), e1800690. <https://doi.org/10.1002/biot.201800690>
- Huen, M. S. Y., Li, X., Lu, L.-Y., Watt, R. M., Liu, D.-P., & Huang, J.-D. (2006). The involvement of replication in single stranded oligonucleotide-mediated gene repair. *Nucleic Acids Research*, 34(21), 6183–6194. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl852>
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR–Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233–239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kandler, O., Schleifer, K. H., & Dandl, R. (1968). Differentiation of *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder and *Streptococcus faecium* Orla-Jensen based on the amino acid composition of their murein. *Journal of Bacteriology*, 96(6), 1935–1939. <https://doi.org/10.1128/jb.96.6.1935-1939.1968>
- Kazi, T. A., Acharya, A., Mukhopadhyay, B. C., Mandal, S., Arukha, A. P., Nayak, S., & Biswas, S. R. (2022). Plasmid-based gene expression systems for lactic acid bacteria: A review. *Microorganisms*, 10(6), 1132. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061132>
- Kiewiet, R., Kok, J., Seegers, J. F. M. L., Venema, G., & Bron, S. (1993). The mode of replication is a major factor in segregational plasmid instability in *Lactococcus lactis*.

-
- Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 358–364.
<https://doi.org/10.1128/aem.59.2.358-364.1993>
- Kim, W.-J., Heo, T.-R., & So, J.-S. (1996). Optimized transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* IL1403. *Biotechnology Techniques*, 10(8), 553–558.
<https://doi.org/10.1007/BF00157360>
- Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M. M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M., & Kuipers, O. P. (1997). Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: Transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4581–4584.
<https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4581-4584.1997>
- Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: Interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 212–238. <https://doi.org/10.1128/mmbr.61.2.212-238.1997>
- Kok, J. (1990). Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 87(1–2), 15–42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04877.x>
- Kok, J., van der Vossen, J. M., & Venema, G. (1984). Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 726–731. <https://doi.org/10.1128/aem.48.4.726-731.1984>
- Kok, J., van Gijtenbeek, L. A., de Jong, A., van der Meulen, S. B., Solopova, A., & Kuipers, O. P. (2017). The evolution of gene regulation research in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, 220–243. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux028>
- Konrad, G., Kleinschmidt, T., & Faber, W. (2012). Ultrafiltration flux of acid whey obtained by lactic acid fermentation. *International Dairy Journal*, 22(1), 73–77.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.08.005>
- Koutina, G., Knudsen, J. C., Andersen, U., & Skibsted, L. H. (2014). Temperature effect on calcium and phosphorus equilibria in relation to gel formation during acidification of skim milk. *International Dairy Journal*, 36(1), 65–73.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.003>
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G. G. A., Luesink, E. J., & de Vos, W. M. (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27299–27304.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27299>
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G. G. A., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 64(1), 15–21. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00100-X)
- Leenay, R. T., Vento, J. M., Shah, M., Martino, M. E., Leulier, F., & Beisel, C. L. (2019). Genome editing with CRISPR–Cas9 in *Lactobacillus plantarum* revealed that editing outcomes can vary across strains and between methods. *Biotechnology Journal*, 14(3), e1700583. <https://doi.org/10.1002/biot.201700583>
- Lemieux, L., & Simard, R. E. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: Their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Lait*, 72(4), 335–385. <https://doi.org/10.1051/lait:1992426>
- Leroy, F., & de Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67–78.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>

- Li, T. T., Tian, W. L., & Gu, C. T. (2021). Elevation of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris to the species level as *Lactococcus cremoris* sp. nov. and transfer of *Lactococcus lactis* subsp. tractae to *Lactococcus cremoris* as *Lactococcus cremoris* subsp. tractae comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(3), 004727. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004727>
- Li, X., Costantino, N., Lu, L.-Y., Lui, D., Watt, R. M., Cheah, K. S. E., Court, D. L., & Huang, J.-D. (2003). Identification of factors influencing strand bias in oligonucleotide-mediated recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 31(22), 6674–6687. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg844>
- Lilly, J., & Camps, M. (2015). Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiology Spectrum*, 3(1), PLAS-0029-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0029-2014>
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2009). Taxonomic outline of the phylum *Firmicutes*. In W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., pp. 15–17). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_2
- Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S. D., & Gruss, A. (1996). Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178(3), 931–935. <https://doi.org/10.1128/jb.178.3.931-935.1996>
- Marraffini, L. A. (2014). *Protocol for new spacer cloning in pCas9*. Addgene. (Accessed March 12, 2024).
- Mayo, B. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Microbiología (Madrid, Spain)*, 9, 90–106. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1340-3_4
- McIntyre, D. A., & Harlander, S. K. (1989). Genetic transformation of intact *Lactococcus lactis* subsp. lactis by high-voltage electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3), 604–610. <https://doi.org/10.1128/aem.55.3.604-610.1989>
- McKay, L. L., & Baldwin, K. A. (1984). Conjugative 40-megadalton plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. diacetylactis DRC3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1), 68–74. <https://doi.org/10.1128/aem.47.1.68-74.1984>
- McKay, L. L., Baldwin, K. A., & Walsh, P. M. (1980). Conjugal transfer of genetic information in group N streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(1), 84–91. <https://doi.org/10.1128/aem.40.1.84-91.1980>
- Mierau, I., & Kleerebezem, M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 705–717. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0107-6>
- Miyoshi, A., Bermúdez-Humarán, L. G., Ribeiro, L. A., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P., & Azevedo, V. (2006). Heterologous expression of *Brucella abortus* GroEL heat-shock protein in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories*, 5, Article 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-14>
- Miyoshi, A., Jamet, E., Commisaire, J., Renault, P., Langella, P., & Azevedo, V. (2004). A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 239, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.018>
- Murphy, K. C. (1998). Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(8), 2063–2071. <https://doi.org/10.1128/jb.180.8.2063-2071.1998>
- Oh, J.-H., & van Pijkeren, J.-P. (2014). CRISPR–Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. *Nucleic Acids Research*, 42(17), e131. <https://doi.org/10.1093/nar/gku623>

- Ohse, M., Takahashi, K., Kadowaki, Y., & Kusaoke, H. (1995). Effects of plasmid DNA sizes and several other factors on transformation of *Bacillus subtilis* ISW1214 with plasmid DNA by electroporation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(8), 1433–1437. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.1433>
- Oren, A., & Garrity, G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10), 005056. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>
- O’Sullivan, D. J., & Klaenhammer, T. R. (1993). High- and low-copy-number *Lactococcus* shuttle cloning vectors with features for clone screening. *Gene*, 137(2), 227–231. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90011-Q](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90011-Q)
- Quiberoni, A., Rezaiki, L., El Karoui, M., Biswas, I., Tailliez, P., & Gruss, A. (2001). Distinctive features of homologous recombination in an “old” microorganism, *Lactococcus lactis*. *Research in Microbiology*, 152(2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01183-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01183-4)
- Radziwill-Bienkowska, J. M., Robert, V., Drabot, K., Chain, F., Cherbuy, C., Langella, P., Thomas, M., Bardowski, J. K., Mercier-Bonin, M., & Kowalczyk, M. (2017). Contribution of plasmid-encoded peptidase S8 (PrpP) to adhesion and transit in the gut of *Lactococcus lactis* IBB477 strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 5709–5721. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8334-1>
- Ribeiro, L. A., Azevedo, V., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Dieye, Y., Piard, J.-C., Gruss, A., & Langella, P. (2002). Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: A first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 910–916. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.910-916.2002>
- Rudolph, L. (2025). *Transformation und nisin-induzierte Expression des recT-Gens in Lactococcus cremoris LTH 7122 und Lactococcus lactis ssp. lactis LTH 7123* [Bachelorarbeit, Universität Hamburg].
- Ruiz-Masó, J. A., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M., & del Solar, G. (2015). Plasmid rolling-circle replication. *Microbiology Spectrum*, 3(1), PLAS-0035-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0035-2014>
- Rumask, L. (2024). *Construction and validation of a recombinant plasmid for Lactococcus lactis genetic engineering* [Masterarbeit, Universität Hamburg].
- Saf, J.-A. (2024). *Konstruktion von Shuttle-Vektoren zur genetischen Modifikation von Lactococcus lactis* [Bachelorarbeit, Universität Hamburg].
- Santos, J. M. M., Monteiro, G. A. A., Prazeres, D. M. de F. T., & Duarte, S. O. D. (2021). One-plasmid based CRISPR-Cas9 editing for gene deletion in *Lactococcus lactis* [Preprint]. Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-306012/v1>
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Sayers, E. W., Beck, J., Bolton, E. E., Brister, J. R., Chan, J., Connor, R., Feldgarden, M., Fine, A. M., Funk, K., Hoffman, J., Kannan, S., Kelly, C., Klimke, W., Kim, S., Lathrop, S., Marchler-Bauer, A., Murphy, T. D., O’Sullivan, C., Schmieder, E., ... Pruitt, K. D. (2025). Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D20–D29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae979>
- Schäfer, J., Sebald, K., Dunkel, A., Hofmann, T., Rosenthal, I., Schuster, R., Atamer, Z., & Hinrichs, J. (2019). A feasibility study on the pilot scale manufacture of fresh cheese from

- skim milk retentates without acid whey production: Effect of calcium content on bitterness and texture. *International Dairy Journal*, 93, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.01.012>
- Schroeter, J., & Klaenhammer, T. (2009). Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 292(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01442.x>
- Schuster, A. (2025a). *Auswirkungen auf die Transformationseffizienz auf Lactococcus lactis durch Kombination von verschiedenen Plasmid-Varianten* [Projektstudie, Universität Hamburg].
- Schuster, A. (2025b). *Untersuchung der Transformationseffizienz und Induzierbarkeit von Mehrplasmidsystemen in Lactococcus cremoris LTH 7122* [Bachelorarbeit, Universität Hamburg].
- Sebald, K., Dunkel, A., Schäfer, J., Hinrichs, J., & Hofmann, T. (2018). Sensoproteomics: A new approach for the identification of taste-active peptides in fermented foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(42), 11092–11104. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04479>
- Seegers, J. F. M. L., Bron, S., Franke, C. M., Venema, G., & Kiewiet, R. (1994). The majority of lactococcal plasmids carry a highly related replicon. *Microbiology*, 140(6), 1291–1300. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-6-1291>
- Shahbandeh, M. (2025a, 25. Juni). *Whey protein: global market size 2032* | Statista. <https://www.statista.com/statistics/728005/global-whey-protein-market-size/> Zugriff am: 17.09.2025
- Shahbandeh, M. (2025b, 27. Juni). *Dairy market revenue worldwide 2018-2030* | Statista. <https://www.statista.com/statistics/502280/global-dairy-market-value/> Zugriff am: 17.09.2025
- Siezen, R. J. (1999). Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. In W. N. Konings, O. P. Kuipers, & J. H. J. Huis Veld (Eds.), *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications* (pp. 139–155). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4>
- Siezen, R. J., Bruinenberg, P. G., Vos, P., Alen-Boerrigter, I. van, Nijhuis, M., Alting, A. C., Exterkate, F. A., & de Vos, W. M. (1993). Engineering of the substrate-binding region of the subtilisin-like, cell-envelope proteinase of *Lactococcus lactis*. *Protein Engineering*, 6(8), 927–937. <https://doi.org/10.1093/protein/6.8.927>
- Siezen, R. J., de Vos, W. M., Leunissen, J. A. M., & Dijkstra, B. W. (1991). Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Engineering*, 4(7), 719–737. <https://doi.org/10.1093/protein/4.7.719>
- Siezen, R. J., Renckens, B., van Swam, I., Peters, S., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2005). Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8371–8382. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8371-8382.2005>
- Silva, I. N., Duarte, S., Moreira, L. M., & Monteiro, G. A. (2017). Draft genome sequence of the plasmid-free *Lactococcus lactis* subsp. lactis strain LMG 19460. *Genome Announcements*, 5(16), e00210-17. <https://doi.org/10.1128/genomea.00210-17>
- Simon, D., & Chopin, A. (1988). Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie*, 70(4), 559–566. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0300-9084(88)90093-4)

- Song, X., Liu, L., Liu, X.-X., Xiong, Z.-Q., Xie, C.-L., Wang, S.-J., & Ai, L.-Z. (2021). Single-plasmid systems based on CRISPR-Cas9 for gene editing in *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*, 104(10), 10576–10585. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19901>
- Song, X., Zhang, X., Xiong, Z., Liu, X., Xia, Y., Wang, S., & Ai, L. (2020). CRISPR-Cas-mediated gene editing in lactic acid bacteria. *Molecular Biology Reports*, 47(10), 8133–8144. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05820-w>
- Statistics Kingdom. (2017). ANOVA Calculator. <https://www.statskingdom.com/180Anova1way.html> Zugriff am: 27.08.2025
- Steele, J. L., & McKay, L. L. (1989). Conjugal transfer of genetic material by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11007. *Plasmid*, 22(1), 32–43. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(89\)90033-4](https://doi.org/10.1016/0147-619X(89)90033-4)
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
- Tarazanova, M., Beerthuyzen, M., Siezen, R., Fernández-Gutiérrez, M. M., de Jong, A., van der Meulen, S., Kok, J., & Bachmann, H. (2016). Plasmid complement of *Lactococcus lactis* NCDO712 reveals a novel pilus gene cluster. *PLOS ONE*, 11(12), e0167970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167970>
- Thomason, L. C., Sawitzke, J. A., Li, X., Costantino, N., & Court, D. L. (2014). Recombineering: Genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Current Protocols in Molecular Biology*, 106(1), 1.16.1–1.16.39. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0116s106>
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Poyart-Salmeron, C., & Courvalin, P. (1991). Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *Gene*, 102(1), 99–104. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90546-N](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90546-N)
- van der Els, S., James, J. K., Kleerebezem, M., & Bron, P. A. (2018). Versatile Cas9-driven subpopulation selection toolbox for *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8), e02752-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02752-17>
- van Mastrigt, O., Di Stefano, E., Hartono, S., Abee, T., & Smid, E. J. (2018). Large plasmidome of dairy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis FM03P encodes technological functions and appears highly unstable. *BMC Genomics*, 19, Article 620. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5005-2>
- van Pijkeren, J. P., & Britton, R. A. (2014). Precision genome engineering in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S10>
- van Pijkeren, J.-P., & Britton, R. A. (2012). High efficiency recombineering in lactic acid bacteria. *Nucleic Acids Research*, 40(10), 4293–4305. <https://doi.org/10.1093/nar/gks147>
- van Pijkeren, J.-P., Neoh, K. M., Sirias, D., Findley, A. S., & Britton, R. A. (2012). Exploring optimization parameters to increase ssDNA recombineering in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus reuteri*. *Bioengineered*, 3(4), 209–217. <https://doi.org/10.4161/bioe.21049>
- Vento, J. M., Crook, N., & Beisel, C. L. (2019). Barriers to genome editing with CRISPR in bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(9–10), 1327–1341. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02195-1>
- Vos, P., Boerrigter, I. J., Buist, G., Haandrikman, A. J., Nijhuis, M., de Reuver, M. B., Siezen, R. J., Venema, G., de Vos, W. M., & Kok, J. (1991). Engineering of the *Lactococcus lactis* serine proteinase by construction of hybrid enzymes. *Protein Engineering*, 4(4), 479–484. <https://doi.org/10.1093/protein/4.4.479>

- Vos, P., Simons, G., Siezen, R. J., & de Vos, W. M. (1989). Primary structure and organization of the gene for a procaryotic, cell envelope-located serine proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 264(23), 13579–13585. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)80036-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)80036-9)
- Vos, P., van Asseldonk, M., van Jeveren, F., Siezen, R., Simons, G., & de Vos, W. M. (1989). A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2795–2802. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2795-2802.1989>
- Wang, C., Cui, Y., & Qu, X. (2020). Optimization of electrotransformation (ETF) conditions in lactic acid bacteria (LAB). *Journal of Microbiological Methods*, 174, 105944. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105944>
- Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M. J., Kuipers, O. P., van Sinderen, D., & Kok, J. (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3256–3270. <https://doi.org/10.1128/jb.01768-06>
- Willetts, N., & Wilkins, B. (1984). Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiological Reviews*, 48(1), 24–41. <https://doi.org/10.1128/mr.48.1.24-41.1984>
- Wu, H., Tian, K., Feng, J., Qi, H., & Qiao, J. (2022). Systems-level analysis of the global regulatory mechanism of CodY in *Lactococcus lactis* metabolism and nisin immunity modulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(5), e01847-21. <https://doi.org/10.1128/aem.01847-21>
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103–119. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90120-9)
- Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Court, D. L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5978–5983. <https://doi.org/10.1073/pnas.100127597>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, Y., Song, F., Yang, H., Li, D., Zhang, N., Huang, K., He, X., Wang, M., Tian, H., & Li, C. (2023). Construction of a food-grade gene editing system based on CRISPR-Cas9 and its application in *Lactococcus lactis* NZ9000. *Biotechnology Letters*, 45(8), 955–966. <https://doi.org/10.1007/s10529-023-03398-4>

10 Anhang

I Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 75: Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS. -: kein gefährlicher Stoff nach GHS.

Chemikalie	Hersteller und Artikelnummer	H Sätze	P Sätze	GHS-Symbol
2-Propanol $\geq 99,5$ % zur Synthese	Carl Roth GmbH + Co KG 9866.5	H225, H319, H336	P210, P233, P305 + P338	
Acrylamid-Lösung 40 %	Carl Roth GmbH + Co. KG T802.1	H301, H315, H317, H319, H332, H340, H350, H361f, H372	P201, P280, P301+P310, P302+P352, P305+P351+P338, P308+P313	
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH + Co. KG 5210.3	-	-	
Agarose LE	Biozym Biotech Trading GmbH 84004	-	-	
Ammoniumperoxodisulfat (≥ 99 %)	SERVA Elektrophoresis GmbH 13375	H272, H302, H315, H319, H334, H317, H335	P220, P280, P301+P312, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338	
BHI-Bouillon	Merck KGaA Millipore 1.10493.0500	-	-	
Brilliant Blau R-250	Carl Roth GmbH + Co. KG 3862.2	-	-	
Bromphenolblau ≥ 95 %	Thermo Fisher Scientific 11488387	-	-	
Calciumchlorid ≥ 98 %, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG CN93.1	H319	P280, P305+P351+P338, P337+P313	
Calciumchlorid-Dihydrat ≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 5239.1	H319	P280, P305+P351+P338	
Chloramphenicol ($\geq 98,5$ %)	AppliChem GmbH A1806.0025	H350, H361d	P201, P202, P280, P308+P313, P405, P501	

10 Anhang

Chemikalie	Hersteller und Artikelnummer	H Sätze	P Sätze	GHS-Symbol
D(+)-Glucosemonohydrat ≥99 %	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH 10316113	-	-	
D(+)-Saccharose ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 9097.1	-	-	
Dimethylsulfoxid 99,5 % zur Synthese	Carl Roth GmbH + Co. KG 7029.1	-	-	
Dithiothreitol ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 6908.2	H302, H315, H319, H335, H412	P260, P280, P305+P351+P338, P337+P313	
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat ≥99 %	AppliChem GmbH 131669.1209	H332, H373	P260, P271, P304+P340, P312, P314, P501	 
Eisessig ≥99,8 %	VWR International GmbH 20104.298	H226, H314	P210, P280, P260, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310	
Erythromycin ≥95 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 4166.1	H317, H334	P261, P280, P284, P304 + 340, P342 + P311, P501	
Ethanol vergällt ≥96 %	Carl Roth GmbH + Co. KG T171.1	H225, H319	P210, P233, P305+P351+P338	
Ethanol ≥99,8 %; für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG 1HPH.1	H225, H319	P210, P233, P305+P351+P338	
Gigasept® AF Forte	Schülke & Mayr GmbH	H302, H312, H314, H318, H371, H400, H410	P260, P273, P280, P310, P301 + P330 + P331, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338	   
Glycerin ROTIPUR AN® ≥ 99,5 %, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG 3783.1	-	-	
Glycin ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 3187.1	-	-	
Hefeextrakt pulverisiert	Carl Roth GmbH + Co. KG 2363.3	-	-	

10 Anhang

Chemikalie	Hersteller und Artikelnummer	H Sätze	P Sätze	GHS-Symbol
Imidazol ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 3899.4	H302, H314, H360D	P202, P270, P280, P305+P351+P338, P310	
IPTG ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG CN08.1	-	-	
Kaliumacetat ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 4986.1	-	-	
Kaliumchlorid ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 6781.3	-	-	
Kanamycin-Sulfat ≥750 IU/mg	Carl Roth GmbH + Co. KG T832.1	H360d	P260, P308+P313	
LB Agar	VWR International BV 84684.0500	-	-	
LB Bouillon	VWR International BV 84649.0500	-	-	
Lysozym ≥45000 FIP U/mg	Carl Roth GmbH + Co. KG 8259.1	H334	P260, P342+P311	
M17 Agar	Merck KGaA 1.15108.0500	-	-	
M17 Bouillon	Merck KGaA 1.15029.0500	-	-	
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG T145.2	-	-	
Magnesiumchlorid ≥98 %	Merck KGaA 8.14733.0100	-	-	
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG T881.1	H301, H318, H373	P260, P280, P301+P310, P305+P351+P338, P308+P313	
MOPS PUFFERAN® ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 6979.2	-	-	
Natriumacetat ≥98,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG X891.1	-	-	

10 Anhang

Chemikalie	Hersteller und Artikelnummer	H Sätze	P Sätze	GHS-Symbol
Natriumchlorid ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG P029.2	-	-	
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat ≥98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG T879.1	-	-	
Natriumhydroxid ≥98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 6771.1	H290, H314	P233, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310	
Natronhydroxid-Lösung 1 M	Carl Roth GmbH + Co. KG K021.1	H290, H314	P260, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310, P501	
Nisin aus Lactococcus lactis (2,5 %; ≥900 IU/mg)	Sigma-Aldrich N5764-1G	-	-	
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG 8986.1	-	-	
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	VWR International GmbH 0780-10L	H319, H335, H315	P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338	
RNase-freies Wasser	QIAGEN GmbH 1018017	-	-	
Rubidiumchlorid ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 4471.4	-	-	
Salzsäure 2 M	Carl Roth GmbH + Co. KG T134.1	H290	P234, P390, P406	
SDS ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 2326.1	H228, H302+H332, H315, H318, H335, H412	P210, P261, P280, P302+P352, P305+P351+P338, P312	
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG 2367.1	H225, H302+H332, H314	P210, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310	
Trinatriumcitrat-Dihydrat (≥99,9 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG HN12.1	-	-	-

10 Anhang

Chemikalie	Hersteller und Artikelnummer	H Sätze	P Sätze	GHS-Symbol
TRIS PUFFERAN® (≥99,9 %)	Carl Roth GmbH + Co KG 5429.3	-	-	
X-β-Gal	Carl Roth GmbH + Co KG 2315.2	H302, H312, H332	P301+330+331, P302+352	

Tabelle 76: Verwendete Reagenzien und Hersteller. Alle Reagenzien wurden bei -20 °C gelagert.

Reagenzien	Hersteller und Artikelnummer	Beschreibung
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs GmbH, N3231S	6 x
Adenosintriphosphat (ATP)	New England Biolabs GmbH, P0756S	10 mM
NEBuffer™ r3.1	New England Biolabs GmbH, B6003S	10 x
BglII	New England Biolabs GmbH, R0144 S	10.000 U/mL
BsaI-HF®v2	New England Biolabs GmbH, R3733 S	20.000 U/mL
dNTP-Mix (≥99 %; 10 mM)	New England Biolabs GmbH, N0447S	Gesamtkonzentration: 10 mM in Reinstwasser, jeweils 2,5 mM
Exonuklease I	New England Biolabs GmbH, M0293S	20.000 U/mL
Gel Red	GeneOn GmbH, S445	10000 x
GeneRuler™ 1 kb DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, SM0311	6 x
Lambda DNA/HindIII Marker DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, SM0101	6 x
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit	New England Biolabs GmbH, M5520	-
PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter	Thermo Fisher Scientific, 26614	-
Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific, F548S	2 x Master Mix mit Phusion Hot Start II DNA-Polymerase
Proteinase K	QIAGEN GmbH, Cat. No. 19131	20 mg/mL
PstI	New England Biolabs GmbH, R0140S	20.000 U/mL
PstI-HF®	New England Biolabs GmbH, R3140	20.000 U/mL
PvuI-HF®	New England Biolabs GmbH, R3150	20.000 U/mL
Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, M0491S	2000 U/mL
Q5® Reaktionspuffer	New England Biolabs GmbH, B9027S	5 x
RNase A	QIAGEN GmbH, Cat. No. 19101	7000 U/mL
Sall-HF®	New England Biolabs GmbH, R3138	20.000 U/mL
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)	New England Biolabs GmbH, M0371S	1000 U/mL
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, M0202S	400.000 U/mL
T4 DNA Ligase Reaktionspuffer	New England Biolabs GmbH, B0202S	10 x

Reagenzien	Hersteller und Artikelnummer	Beschreibung
T4 Polynucleotide Kinase (PNK)	New England Biolabs GmbH, M0201S	10.000 U/mL
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, M0267S	5000 U/mL
ThermoPol® Reaktionspuffer	New England Biolabs GmbH, B9004S	10 x
TriTrack DNA Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific, R1161	6 x
XbaI	New England Biolabs GmbH, R0145S	20.000 U/mL

Tabelle 77: Verwendete Kits und Hersteller.

Kit	Hersteller und Artikelnummer	Verwendungszweck
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs GmbH, Cat. No. T1030S	Reinigung PCR-Produkte und Restriktionsverdau
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Cat. No. 27104	Plasmid-Isolation
QIAquick® PCR & Gel Cleanup Kit	QIAGEN GmbH, Cat. No. 28506	Reinigung PCR-Produkte, Agarosegele und Restriktionsverdau
DNEasy® Blood and Tissue Kit	QIAGEN GmbH, Cat. No. 69504	Genomische DNA-Isolation

II Auflistung der verwendeten Geräte

Tabelle 78: Verwendete Geräte und Hersteller.

Gerät	Modell	Hersteller
Analysenwaage	BP 211 D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav	DX-45	Systec GmbH + Co. KG, Linden, Deutschland
Brutschrank	B 5060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Brutschrank	BD-240	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Dokumentations- und Bildgebungssystem	ChemiDoc™ PL Imaging System 12003154	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Elektroporator	MicroPulser™ Electroporator 1652100	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Heizblock	ThermoMixer® C	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Horizontale Elektrophorese-Kammer	ROTIPHORESE® PROfessional II	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Scientific Products GmbH, Schwabach, Deutschland
PCR-Thermocycler	Mastercycler® nexus GX2	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	WTW Ino Lab pH7110	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim in Oberbayern, Deutschland
Photometer	NanoPhotometer® NP80	Implen GmbH, München, Deutschland
Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph Scientific Products GmbH, Schwabach, Deutschland
Präzisionswaage	EW 4200-2NM	Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Schüttelinkubator	Varioshake® VS 8 O	Lauda Dr. R. Wobser GmbH + Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Sicherheitswerkbank	NU-453-4005	NuAire BioTool Swiss AG, Kirchberg, Schweiz
Spannungsquelle	PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland

Gerät	Modell	Hersteller
Tiefkühler	Tiefkühler No Frost, -20°C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Bieberach a. d. Riß, Deutschland
Ultraschallprozessor	UP200S	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland
Vertikale Elektrophorese- Kammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Vortexmischer	Reax top	Heidolph Scientific Products GmbH, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	5425 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	5804 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

III Allgemeine Verfahren

III.1 Restriktionsverdau

Plasmide und Amplifikate wurden in dieser Arbeit mittels Restriktionsverdau restringiert. Im Allgemeinen wurden für einen Restriktionsverdau 1 µg DNA mit 1 µL (10 oder 20 Units je nach Enzym) des jeweils entsprechenden Restriktionsenzym oder der entsprechenden Restriktionsenzyme für 15 min (*High-Fidelity* Enzyme) oder für 1 h bei 37 °C inkubiert. Wenn die Inkubationstemperatur einem anderen Wert entspricht, wird dies im Weiteren benannt. Anschließend wurde eine Hitzeinaktivierung nach Herstellerangaben entsprechend für die verwendeten Enzyme durchgeführt. Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 76 dargestellt.

III.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Im Allgemeinen wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit einer der drei Polymerasen *Taq* DNA-Polymerase, Q5® High-Fidelity-Polymerase (beides NEB, Frankfurt, Deutschland) und Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Zur Berechnung der Anlagerungstemperatur bei der Polymerase-Kettenreaktion wurde der NEB T_mCalculator (NEB, Frankfurt, Deutschland) für die *Taq* DNA-Polymerase und die Q5® High-Fidelity-Polymerase verwendet. Der T_m Calculator for Primers (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) wurde für den Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix verwendet.

Für die *Taq* DNA-Polymerase wurde die Reaktionszusammensetzung aus Tabelle 79 verwendet. Für die Q5® High-Fidelity-Polymerase wurde das Reaktionsschema aus Tabelle 80 verwendet. Für den Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix, in dem die Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase enthalten ist, wurde die Reaktionszusammensetzung aus Tabelle 81 verwendet. Die Komponenten wurden auf Eis als PCR-Ansätze zusammen pipettiert und anschließend die PCR Programme im *Mastercycler nexus GX2* (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die DNA-Menge, die zur PCR-Ansatz gegeben wurde, betrug bei Plasmidamplifikationen 10–20 ng und bei gDNA Amplifikationen bis zu 1 µg. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle ohne DNA (Englisch: *no template control*, NTC) durchgeführt. Nach Ablauf der PCR wurden die PCR-Produkte bei -20 °C gelagert. Bei Analyse mittels Gelelektrophorese wurde 1 µL des PCR-Produktes verwendet.

Tabelle 79: Zusammensetzung der PCR-Ansätze bei Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen [μL / 25 μL]	Konzentration im Ansatz
10 x ThermoPol® Buffer	2,5	1x
10 mM dNTPs (je 2,5 mM)	0,5	200 μM
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,125	0,625 Units
10 μM <i>Forward</i> -Primer	0,5	0,2 μM
10 μM <i>Reverse</i> -Primer	0,5	0,2 μM
RNase-freies Wasser	ad 25 μL	-

Tabelle 80: Zusammensetzung der PCR-Ansätze bei Verwendung der Q5® High-Fidelity-Polymerase.

Komponente	Volumen [μL / 25 μL]	Konzentration im Ansatz
5 x Q5 Puffer	5	1x
10 mM dNTPs (je 2,5 mM)	0,5	200 μM
Q5® High Fidelity-DNA-Polymerase	0,25	0,02 Units/ μL
10 μM <i>Forward</i> -Primer	1,25	0,5 μM
10 μM <i>Reverse</i> -Primer	1,25	0,5 μM
RNase-freies Wasser	ad 25 μL	-

Tabelle 81: Zusammensetzung der PCR-Ansätze bei Verwendung des Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix.

Komponente	Volumen [μL / 20 μL]	Konzentration im Ansatz
2x Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix	10	1x
10 μM <i>Forward</i> -Primer	1	0,5 μM
10 μM <i>Reverse</i> -Primer	1	0,5 μM
RNase-freies Wasser	ad 20 μL	-

III.3 Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurde eine Kolonie von einer Agar-Platte gepickt und ein Teil der Zellen auf eine frische Agar-Platte übertragen. Die restlichen Zellen wurden in 20 μL ddH₂O suspendiert und anschließend durch Inkubation bei 95 °C für 10 min lysiert. Von diesem Ansatz wurde 1 μL als Vorlage für die PCR Ansätze verwendet. Für die PCR wurde, sofern nicht anders angegeben, die *Taq* DNA-Polymerase von NEB verwendet und die PCR Ansätze wurden wie in Tabelle 79 angegeben pipettiert.

III.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde je nach Größe des zu trennenden DNA-Fragments ein Agarosegel mit 0,8 % Agarose (größere Fragmente oder Plasmide ab ca. 7000 bp), 1 % Agarose (250-10 000 bp) oder 2 % Agarose (<250 bp) verwendet. Dazu wurde die Agarose mit TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgeschossen. Anschließend wurde diese abgekühlt und 0,01 µL/mL GelRed (GeneOn GmbH, Groß-Rohrheim, Deutschland) hinzugegeben. Als DNA-Leiter wurde je nach aufzutrennender Größe der 100 bp DNA-Leiter (NEB, Frankfurt, Deutschland), der GeneRuler 1kb DNA-Leiter (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) oder der Lambda DNA/HindIII Marker DNA-Leiter (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) verwendet. Der DNA-Leiter-Mix, welcher als Marker auf dem Gel mitläuft, wurde mit dem Verhältnis 1:1:4 aus einem Teil DNA-Leiter, einem Teil TriTrack DNA Ladepuffer (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) und vier Teilen RNase-freiem Wasser (QIAGEN, Hildesheim) hergestellt. Die aufgegebenen Proben auf dem Gel enthielten ebenfalls einen von sechs Anteilen TriTrack DNA Ladepuffer. Eventuelle Volumendifferenzen wurden mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die Spannung und die Zeit wurden je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente angepasst. Die Banden wurden mit einer Anregungswellenlänge von 302 nm visualisiert.

III.5 SDS-PAGE Elektrophorese

Für die SDS-PAGE Gelelektrophorese wurde ein Gel bestehend aus einem Trenngel und einem Sammelgel nach Tabelle 82 hergestellt. Der aufgelistete Ansatz bezieht sich auf die Herstellung von zwei Gelen.

Tabelle 82: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele.

Reagenz	Trenngel (12 %)	Sammelgel (7 %)
Reinstwasser	4,5 mL	2,34 mL
Trenngel-Puffer	2,5 mL	-
Sammelgel-Puffer	-	0,96 mL
40 %ige Acrylamid-Lösung	3,0 mL	0,7 mL
10 %ige APS-Lösung	45 µL	20 µL
TEMED	9 µL	6 µL

Der Ansatz für das Trenngel wurde zwischen die in den Gießstand eingespannten Platten gegeben und mit 2-Propanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das 2-Propanol abgegossen und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet und ein Kamm eingesetzt. Nach erneutem Polymerisieren wurde der Kamm entfernt und die Gele unter fließendem VE-Wasser abgespült.

In die erste Tasche jedes SDS-Gels wurden 7 μL PageRuler ungefärbte Proteinleiter (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pipettiert und von den Proben jeweils 20 μL pro Tasche. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 V für 2,5-3 h. Danach wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel mit der Färbelösung für 1 h gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit VE-Wasser gewaschen und für 1,5-2 h mit Entfärbelösung behandelt. Nach ausreichender Entfärbung wurde das Gel bei 302 nm Anregungswellenlänge mit weißer Unterlage fotografiert.

III.5 Reinigung von PCR-Amplifikaten vor der Sanger-Sequenzierung

Für die Reinigung von PCR-Amplifikaten wurden zu 10 μL PCR-Produkt 2 μL Exonuklease und 4 μL rSAP hinzugegeben (beides NEB, Frankfurt, Deutschland) und zunächst 15 min bei 37 °C und anschließend 15 min bei 80 °C inkubiert. Die Konzentration wurde photometrisch mittels *NanoPhotometer NP80* (Implen GmbH, München, Deutschland) bestimmt und mit RNAase-freiem Wasser für die Sequenzierung nach Angabe von MicroSynth eingestellt. Hierzu wurden die DNA-Fragmente mit einer Länge von 100-400 bp auf 2-6 ng/ μL , die DNA-Fragmente mit einer Länge von 401-900 bp auf 4-17 ng/ μL und die DNA-Fragmente mit einer Länge von 901-2000 bp auf 12-70 ng/ μL , mit RNAase-freiem Wasser verdünnt. Als Probevolumen wurden mindestens 12 μL verwendet. Die Sequenzierung-Primer wurden, falls nicht vorrätig bei MicoSynth, separat mit einer Konzentration von 10 pmol/ μL mit RNAase-freiem Wasser angesetzt und ein Volumen von 20 μL mitgeschickt. Das Verfahren zur Reinigung von PCR-Amplifikaten vor der Sanger-Sequenz wurde auf alle PCR-Amplifikate, die in dieser Arbeit Sanger-sequenziert wurden, angewendet.

III.6 Plasmidisolierung aus Gram-positiven Bakterien

Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit, wobei folgende Modifizierung zur Isolation vorgenommen wurde: Das Zellpellet wurde aus 4 mL Übernachtskultur gewonnen und für den Zellaufschluss wurden 225 μL P1-Puffer sowie 25 μL der Lysozym-Stammlösung (100 mg/mL) hinzugegeben. Anschließend wurde das Zellpellet resuspendiert und bei 37 °C für 30 min bei 1000 rpm inkubiert. Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Plasmidisolierung gemäß den Herstellerangaben im Kit.

IV Plasmidkarten

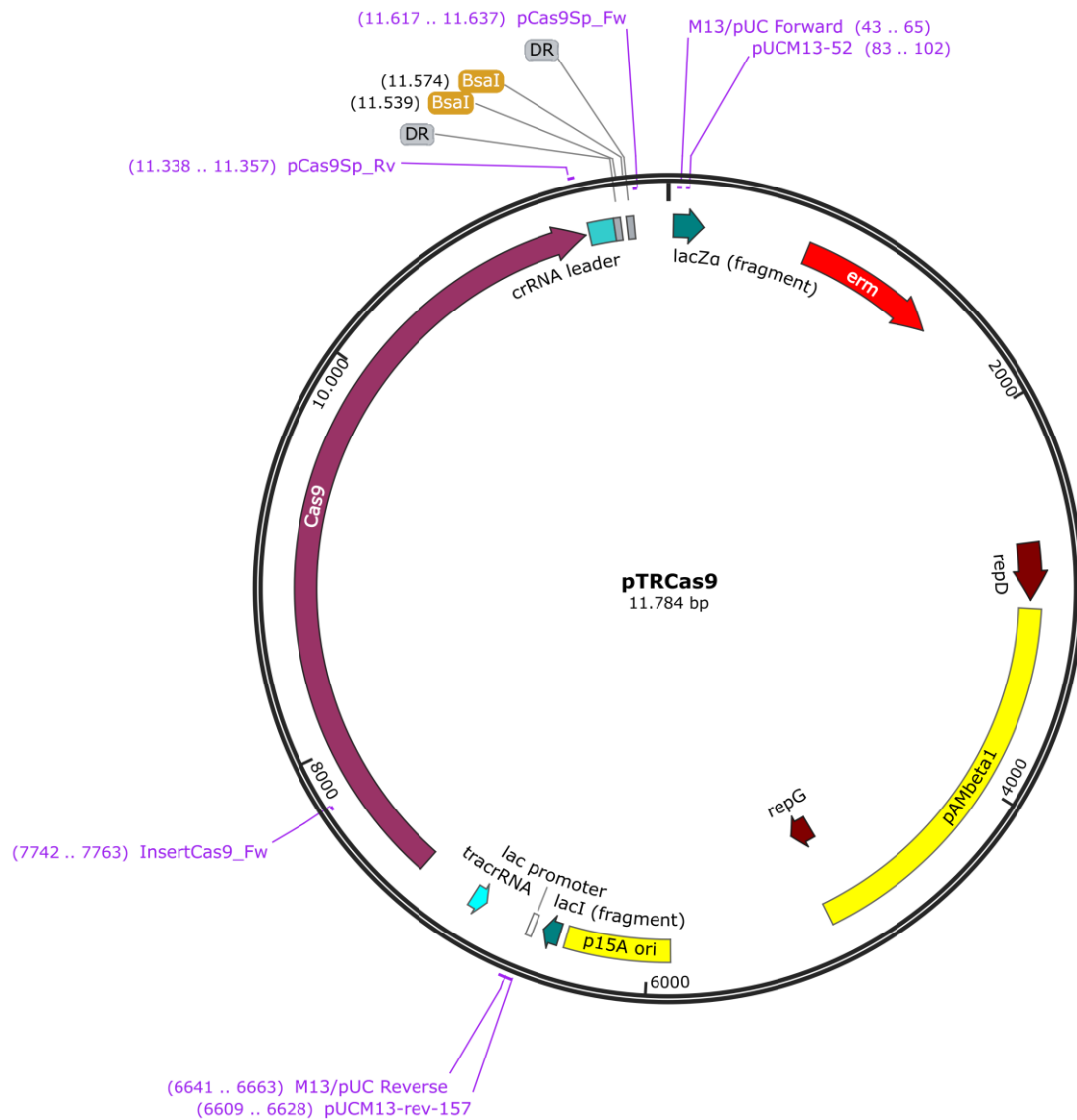


Abbildung 27: Plasmidkarte des Plasmids pTRCas9, generiert mit SnapGene®. In lila dargestellt sind die Primer, die an die Sequenz binden. Orange markiert, die Restriktionsschnittstellen zum Einfügen eines *Spacers*.

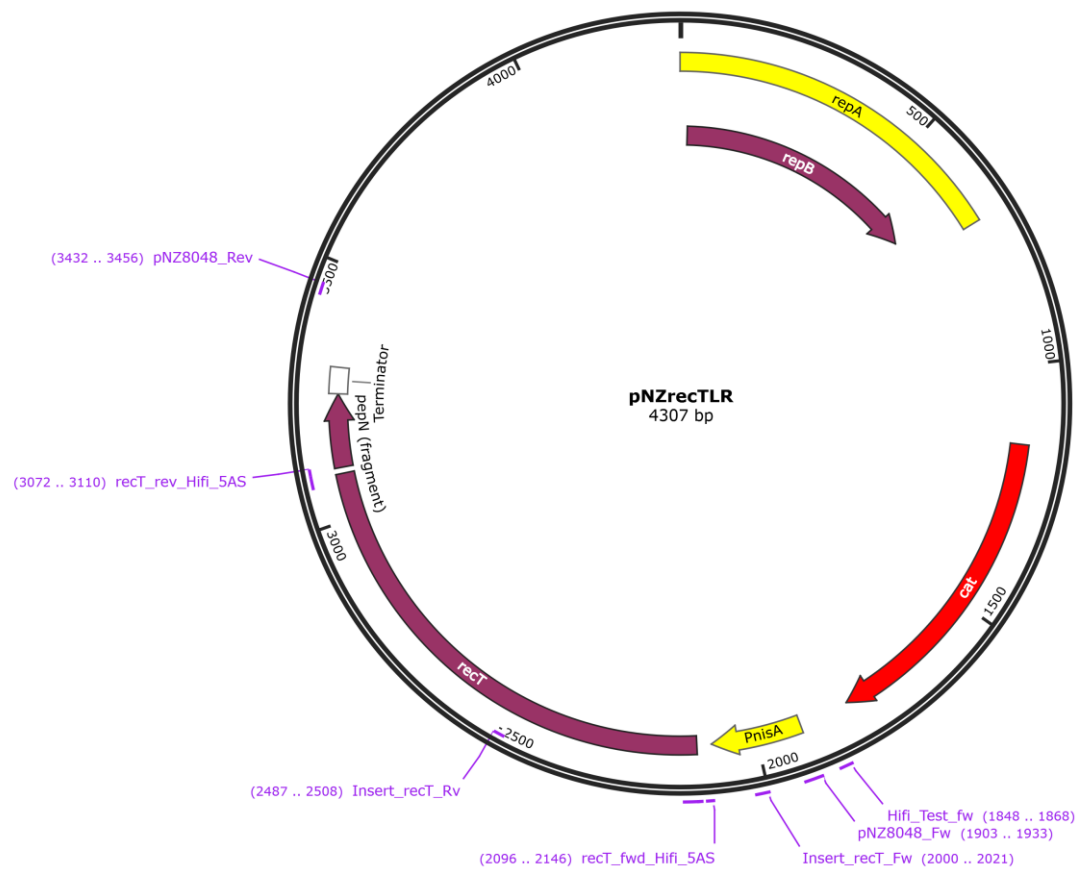


Abbildung 28: Plasmidkarte des Plasmids pNZrecTLR, generiert mit SnapGene®. In lila dargestellt sind die Primer, die an die Sequenz binden.

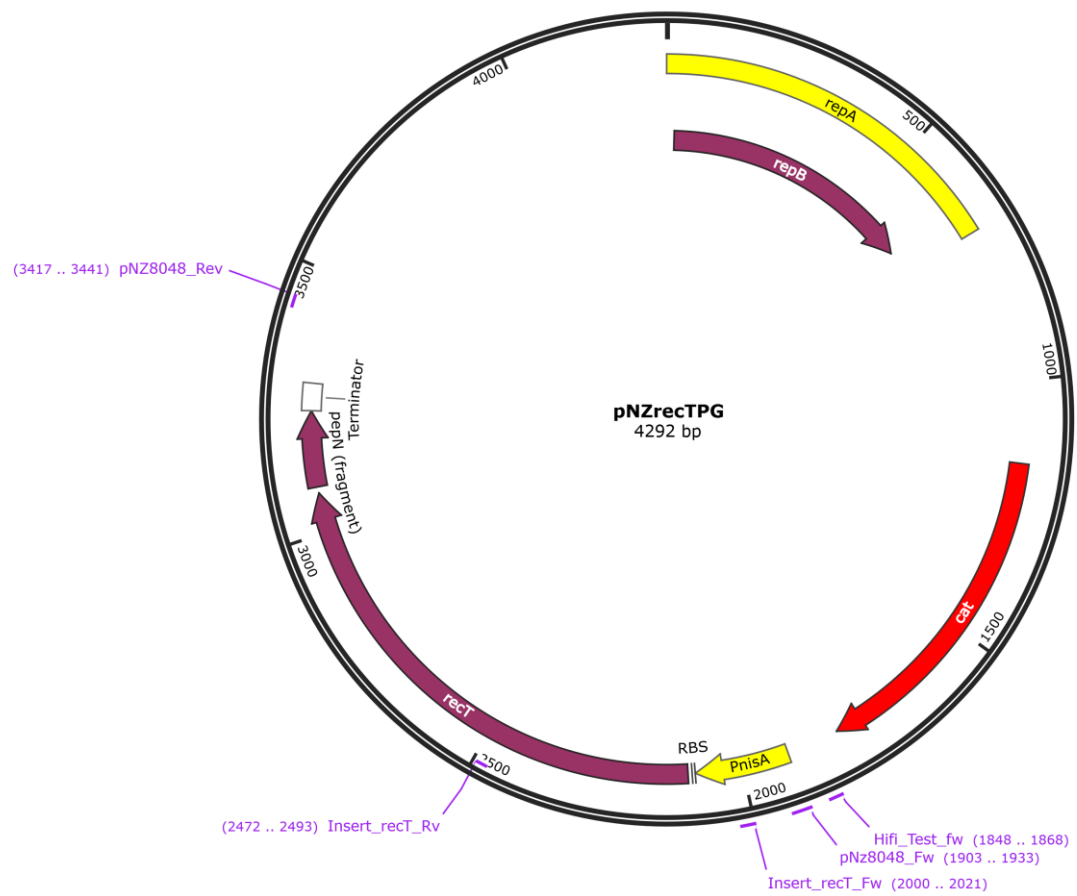


Abbildung 29: Plasmidkarte des Plasmids pNZrecTPG, generiert mit SnapGene®. In lila dargestellt sind die Primer, die an die Sequenz binden.

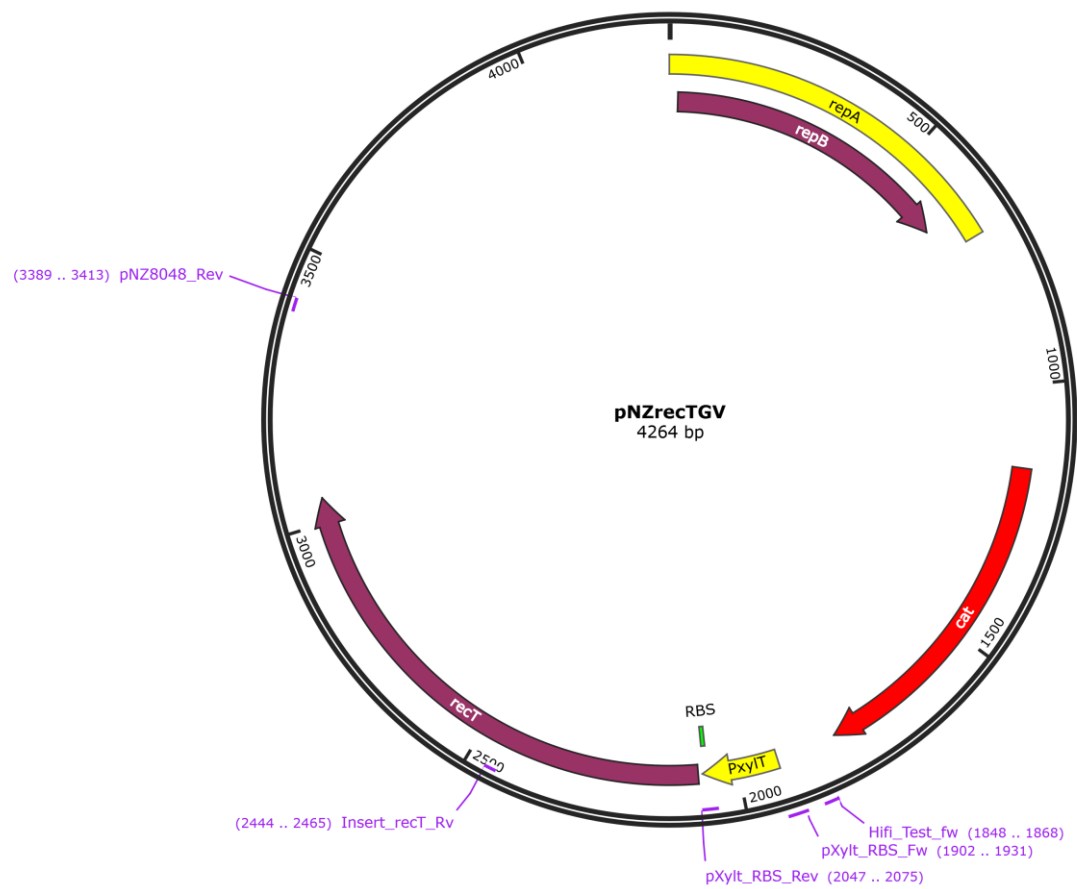


Abbildung 30: Plasmidkarte des Plasmids pNZrecTGV, generiert mit SnapGene®. In lila dargestellt sind die Primer, die an die Sequenz binden.

V Agarosegel-Bilder und Ausschnitt der Sequenzierung

V.1 Agarosegel mit Plasmidisolierungen der Plasmide p428.1D und p428.2D

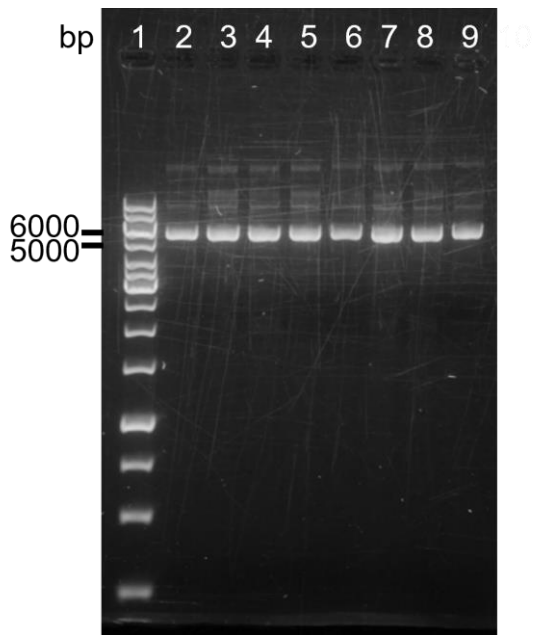


Abbildung 31: Agarose-Gelelektrophorese der Plasmidlösungen der positiven Transformaten von pCas9 mit *Spacer* 1D217 und 2D217. Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2-3: Klon 1:5 1D, Bahn 4-5: 1:7 1D, Bahn 6-7: Klon 1:5 2D, Bahn 8-9: Klon 1:7 2D.

V.2 Agarosegel mit Amplifikaten der Kolonie-PCR des Plasmids pTRCas9oppDBind1

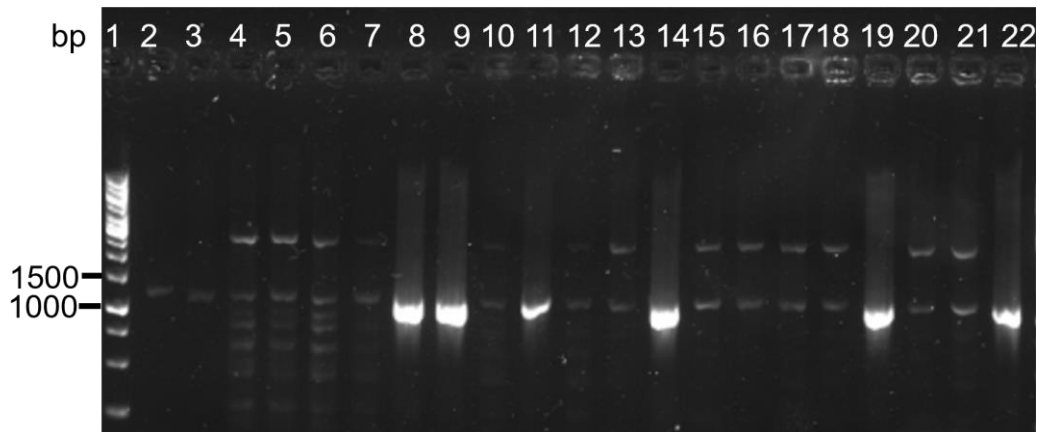


Abbildung 32: Agarose-Gelelektrophorese der Cas9-Insert PCR auf pTRKH2 mit *Spacer* oppDBind1. Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3-12: Fremdproben, Bahn 13-22: Klone oppDBind1.

V.3 Agarosegel mit Amplifikaten der Kolonie-PCR des HiFi-Assemblys

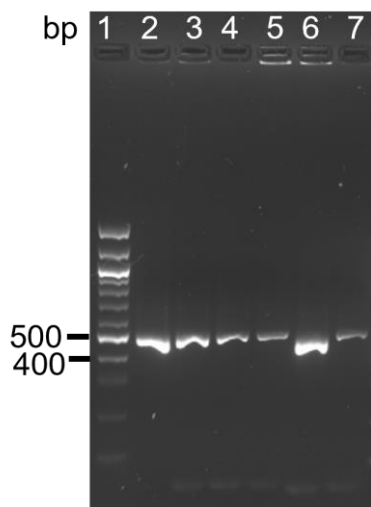


Abbildung 33: Agarose-Gelelektrophorese der *recT-Insert* PCR der HiFi-Assembly Klone. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2-7: Klon PG1-PG6.

V.4 Agarosegel des Amplifikats des Xylose Promotor von *L. lactis* LTH 3882

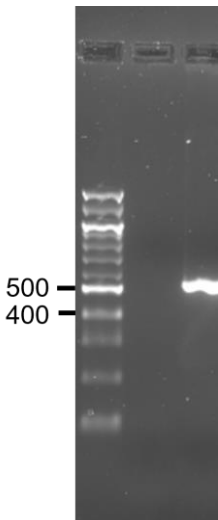


Abbildung 34: Agarose-Gelelektrophorese der A51/A52 PCR von *L. lactis* LTH 3882. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2: NTC Bahn 3: Amplifikat aus Blood & Tissue Isolat *L. lactis* LTH 3882.

V.5 Agarosegel des Xylose Promotor mit Klonierungs-Primern und *Taq* DNA-Polymerase

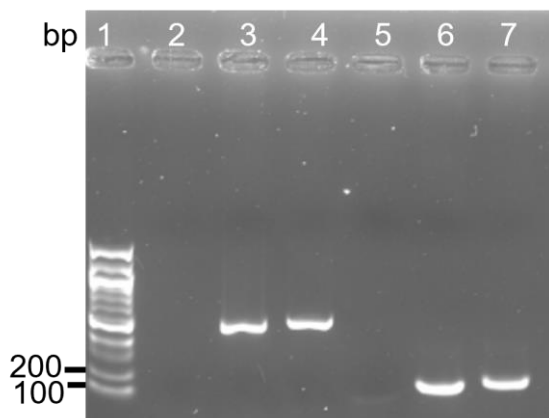


Abbildung 35: Agarose-Gelelektrophorese der PCR mittels *Taq* DNA-Polymerase des Xylose Promotor mit Klonierungs-Primern. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2-4: Fremdproben, Bahn 5: NTC, Bahn 6-7: 1. und 2. Probe.

V.6 Agarosegel des Plasmids pTRKH2 und pNZ8048 in Starterkulturen oder *L. lactis* LTH 7123

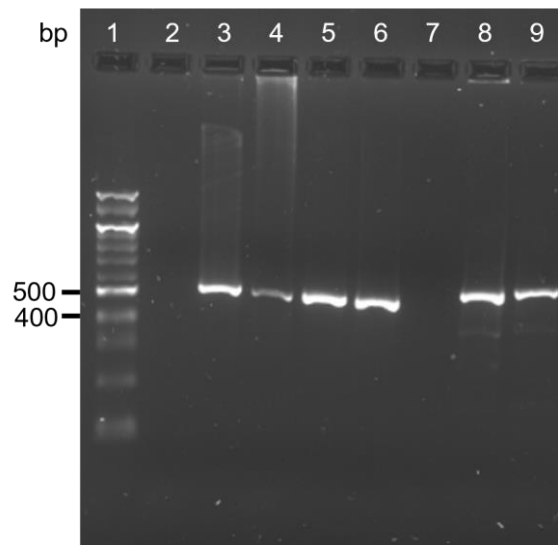


Abbildung 36: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zum Nachweis der Transformation des pNZ8048 in *L. cremoris* LTH 7122 und *L. lactis* LTH 7123. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2-6: Fremdproben Bahn 7: NTC Kolonie PCR pNZ8048 Bahn 8: Kolonie-PCR *L. cremoris* LTH 7122 pNZ8048, Bahn 9: Kolonie-PCR *L. lactis* LTH 7123 pNZ8048.

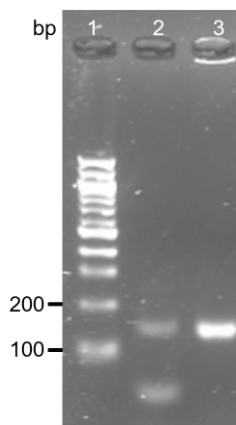


Abbildung 37: Agarose-Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zum Nachweis der Transformation von pTRKH2 in *L. lactis* LTH 7123. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2: NTC Bahn 3: Klon 1.

V.7 Agarosegel der Amplifikate der MAMA-PCR Xylose induzierter Zellen

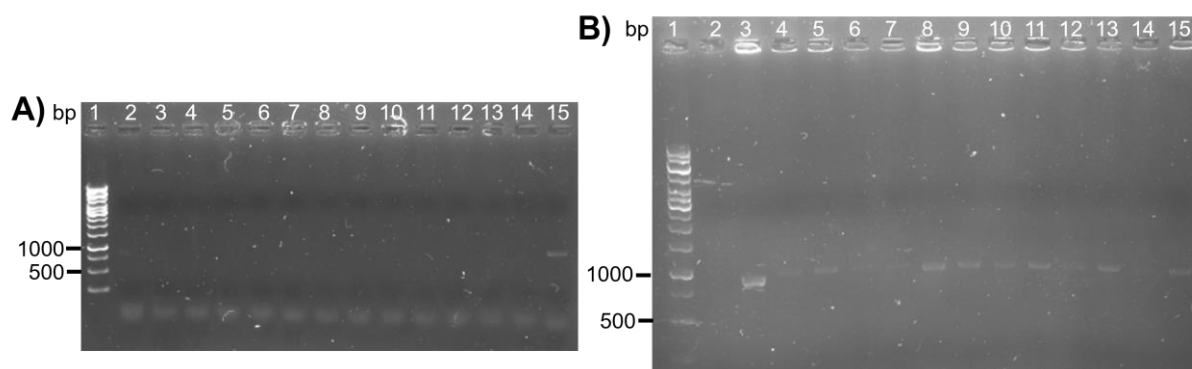


Abbildung 38: Agarose-Gelelektrophorese der **A)** MAMA-PCR *L. lactis* 7123 mit MAMAvrs4 Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3-5: Klone OD 1,8; Bahn 6-8: Klone OD 0,75; Bahn 9-11: Klone OD 0,49 Bahn 12-14: Klone von gemischte OD; Bahn 15: M3. **B)** MAMA-PCR *L. cremoris* LTH 7122 mit MAMAvrs1.1 und XSM17 und XM17. Bahn 1: GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, Bahn 2: NTC, Bahn 3-8: Kon XM17 Bahn 9-14: Klon XSM17 1% Glycin. Bahn 15: M3.

V.8 Agarosegel der Amplifikate der MAMA-PCR der Transformation des Plasmids pTRCas9oppDBind1

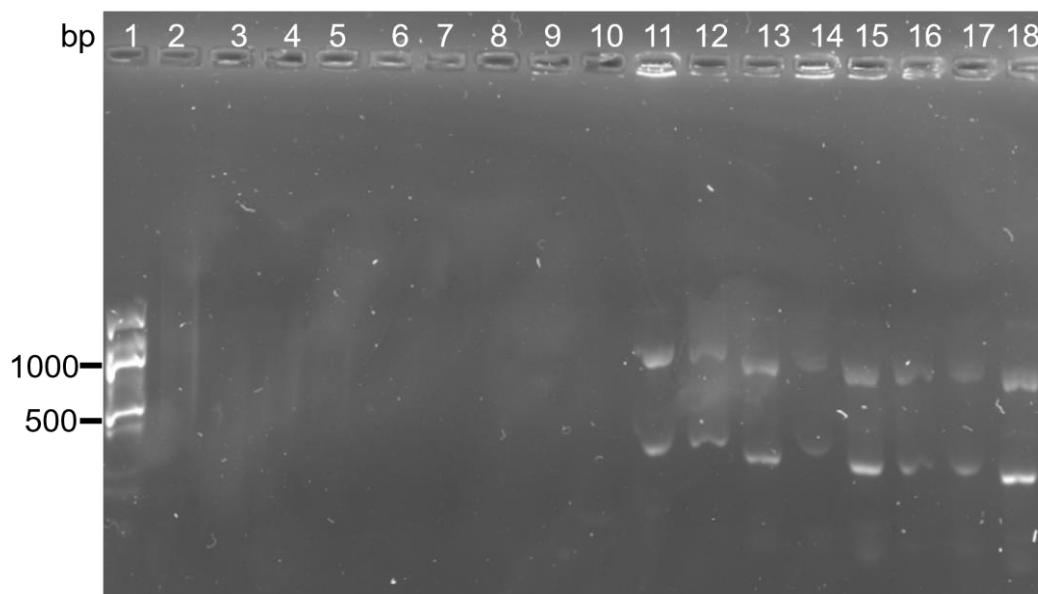


Abbildung 39: Agarose-Gelelektrophorese der MAMA-PCR der pTRCas9oppDBind1 gepoolten Klone. Bahn 1: 100 bp DNA-Leiter, Bahn 2-9: Fremdproben, Bahn 10: NTC MAMA-PCR opppDBind1. Bahn 11: Berlec long Klon, Bahn 12-14: gepoolte Kone Berlec 20 Klone, Bahn 15-18: gepoolte Klone Guo Klone.

V.9 Sequenzierung des Berlec long Klons mit pTRCas9gal

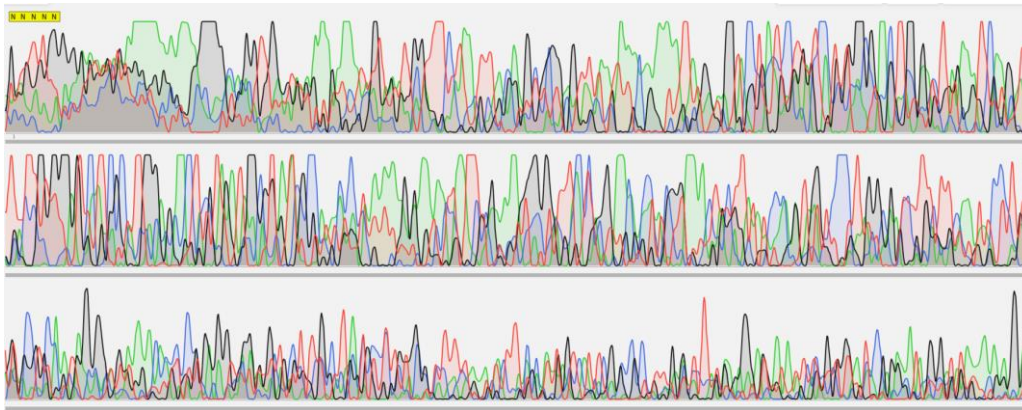


Abbildung 40: Ausschnitt des Sequenzierergebnisses der ab.-Datei eines Berlec long-Klon. Generiert von MicroSynth.

VI Koloniezahlen Milchcitrat-Boullion Fermentation

Tabelle 83: Koloniezahlen zur Fermentation in MCB. Es wurden nur Verdünnungsstufen ausgezählt deren technischen Replikate beide im Bereich 30-300 koloniebildenden Einheiten lag, diese sind **fett** markiert.

Ansatz	Verdünnungsstufen	1. Versuch I und II [KbE]	2. Versuch I und II [KbE]	3. Versuch I und II [KbE]
<i>L. cremoris</i> NZ9000	10 ⁻⁶	72 67	124 82	79 86
	10 ⁻⁷	5 46	19 38	5 5
	10 ⁻⁸	0 0	2 4	1 4
<i>L. cremoris</i> NZ9000*codY3	10 ⁻⁶	126 130	121 126	105 99
	10 ⁻⁷	9 10	12 12	19 4
	10 ⁻⁸	1 1	0 2	0 0
<i>L. cremoris</i> NZ9000*oppDBind	10 ⁻⁶	30 92	96 62	78 102
	10 ⁻⁷	6 9	16 15	6 13
	10 ⁻⁸	1 2	0 4	2 1

VII Sequenzen

VII.1 Sanger-Sequenzierung

Tabelle 84: Sequenzen der Ligationsansätze der Klonierung der *Spacer* auf pCas9. Unterstrichen die *Spacer*-Sequenz.

DNA-Sequenz 5'→3': <i>Spacer</i> auf pCas9 mit pCas9Sp_Rv und pCas9Sp_Fw.
5:1 1D217, pCas9Sp_Rv: TCTTATAACTAAAAATATGGTATAAATACTCTTAATAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTCAAGAC TGAAGTCTAGCTGAGACAAATAGTGCGATTACGAAATTTTTAGACAAAAATAGTCTACGAGGT TTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAACTGAAGGCACAGTTGTCTCGGTTATTGACAG GTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCC ATGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGACTCCATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAG AGGGTTAATACCAGCAGTCGGATACCTTCCTATTCTTTCTGTTAAAGCGTTTTTCATGTTATAATA GGCAAAGAAGAGTAGTGTGATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGC TAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCT TTGGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGG CGACCACACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCC ACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCA CTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGGA CTGTTGGGCGCCATCTCCTTGATGCACCATTCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAA CCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTT GAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCAC TTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTT CGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCGGAATTCGGG AATCTTGACGCGCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGG
5:1 2D217, Pcas9Sp_Fw: NAACCATGTCTTTATGTGTTGGATCAATGCCACTGTTTTGGGACCATTCAAACAGCATAGCTC TAAACCTCGTAGACTATTTTTGTCTAAAAAATTCGTAATCGCACTATTTGTCTCAGCTAGACTT CAGTCTTGAAAAGCCCCTGTATTACTGCATTTATTAAGAGTATTATACCATATTTTTAGTTATTAA GAAATAATCTTCATCTAAAATATACTTCAGTCACCTCCTAGCTGACTCAAATCAATGCGTGTTTC ATAAGACCAGTGATGGATTGATGGATAAGAGTGGCATCTAAACTTCTTTTGTAGACGTATAT CGTTTACGATCAATTGTTGTATCAAATATTTAAAAGCAGCGGGAGCTCCAAGATTGTCACAG TAAATAAATGAATAATATTTTCTGCTTGTTACGTATTGGTTTGTCTCTATGTTTGTATATGCAC TAAGAACTTTATCTAAATTGGCATCTGCTAAAATAACACGCTTAGAAAATTCAGTATTTGCTCA ATAATCTCATCTAAATAATGCTTATGCTGCTCCACAAACAATTGTTTTGTTGTTATCTTCTGGA CTACCCTTCAACTTTTCATAATGACTAGCTAAATATAAAAAATTACATATTTGCTTGGCAGAGC CAGCTCATTTCTTTTTGTAATTCTCCGGCACTAGCCAGCATCCGTTTACGACCGTTTTCTAACT CAAAAAGACTATATTTAGGTAGTTAATGATTAAGTCTTTTTTAACTTCCTTATATCCTTTAGCTT CTAAAAAGTCAATCGGATTTTTTTCAAAGGAACTTCTTTCCATAATTGTGATCCCTAGTAACTCTT TAACGGATTTTAACTTCTTCGATTTCCCTTTTTCCACCTTAGCAACCACTAGGACTGAATAAGCT ACCGTTGGACTATCAAACCAACCATATTTTTTTGGATCCCAGTCTTTTTTACGAGCAATAAGCTT

DNA-Sequenz 5'→3': Spacer auf pCas9 mit pCas9Sp_Rv und pCas9Sp_Fw.

GTCCGAATTTCTTTTTGGTAAAATTGACTCCTTGGAGAATCCGCCTGTCTGTACTTCTGTTTTCT
TGACAATATTGACTTGGGGCATGGACAATACTTTGCGCACTGTGGCAAATCTCGCCCTTTATC
CCAGACAATTTCTCCAGTTTCCCCATTAGTTTCGATTAAAG

7:1 1D217, pCas9Sp_Rv:

ATAACTAAAAATATGGTATAATACTCTTAATAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTCAAGACTGAA
GTCTAGCTGAGACAAATAGTGCGATTACGAAATTTTTTAGACAAAAATAGTCTACGAGGTTTTAG
AGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAACTGAAGGCACAGTTGTCTCGGTTATTGACAGGTTTT
AGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAACTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCCATGTT
TTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGACTCCATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAGAGGG
TTAATACCAGCAGTCGGATACCTTCCTATTCTTTCTGTTAAAGCGTTTTTCATGTTATAATAGGCA
AAAGAAGAGTAGTGTGATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGC
GCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGG
CCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGA
CCACACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACA
GGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTT
CGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGGACTG
TTGGGCGCCATCTCCTTGATGCACCATTCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTA
CTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTTGAG
AGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTA
TGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCAATTTTCG
GCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCGGTATTCGGAATC
TTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCA
GGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCGGANGCCCTGGGCTAC

7:1 2D217, pCas9Sp_Fw:

TCAAACAGCATAGCTCTAAAACCATGTCTTTATGTGTTGGATCAATGCCACTGTTTTGGGACCA
TTCAAACAGCATAGCTCTAAAACCTCGTAGACTATTTTTGTCTAAAAAATTCGTAATCGCACT
ATTTGTCTCAGTAGACTTCAGTCTTGAAAAGCCCCTGTATTACTGCATTTATTAAGAGTATTAT
ACCATATTTTTAGTTATTAAGAAATAATCTTCATCTAAAATATACTTCAGTCACCTCCTAGCTGAC
TCAATCAATGCGTGTTTCATAAAGACCAGTGATGGATTGATGGATAAGAGTGGCATCTAAAAC
TTCTTTTGTAGACGTATATCGTTTACGATCAATTGTTGTATCAAAATATTTAAAAGCAGCGGGAG
CTCCAAGATTCGTCAACGTAAATAAATGAATAATATTTTCTGCTTGTTACGTATTGGTTTGTCT
CTATGTTTGTATATGACTAAGAACTTTATCTAAATTGGCATCTGCTAAAATAACACGCTTAGA
AAATTCAGTATTTGCTCAATAATCTCATCTAAATAATGCTTATGCTGCTCCACAAACAATTGTTT
TTGTTCTGTTATCTTCTGGACTACCCTTCACTTTTTCATAATGACTAGCTAAATATAAAAAATTCAC
ATATTTGCTTGGCAGAGCCAGCTCATTTCTTTTTGTAATTCTCCGGCACTAGCCAGCATCCGT
TTACGACCGTTTTCTAACTCAAAAAGACTATATTTAGGTAGTTTAATGATTAAGTCTTTTTTAACT
TCCTTATATCCTTTAGCTTCTAAAAAGTCAATCGGATTTTTTTCAAAGGAACCTCTTTCATAATT
GTGATCCCTAGTAACTCTTTAACGGATTTTAACTTCTTCGATTTCCCTTTTTCCACCTTAGCAAC
CACTAGGACTGAATAAGCTACCGTTGGACTATCAAAACCACCATATTTTTTTGGATCCCAGTCTT

DNA-Sequenz 5'→3': Spacer auf pCas9 mit pCas9Sp_Rv und pCas9Sp_Fw.

TTTACGAGCAATAAGCTTGTCCGAATTTCTTTTTGGTAAAATTGACTCCTTGGAGAATCCGCCT
GTCTGGACTTCTGTTTTCTTGACAATATTGACTTGGGGCATGGACAATACTTTGCGCACTGGGG
CAAAATCTCGCCCTTTATCCCAGACAATTT

3H281, Pcas9Sp_Rv:

TAACTAAAAATATGGTATAATACTCTTAATAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTCAAGACTGAAG
TCTAGCTGAGACAAATAGTGCGATTACGAAATTTTTAGACAAAAATAGTCTACGAGGTTTTAGA
GCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAACTTTCAGCAACTCTGACACTTCTGCAAAAACGTTTTAG
AGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCCATGTTTTA
GAGCTATGCTGTTTTGAATGGACTCCATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAGAGGGTTA
ATACCAGCAGTCGGATACCTTCCTATTCTTTCTGTAAAGCGTTTTCATGTTATAATAGGCAAAA
GAAGAGTAGTGATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCT
ATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCG
CCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCAC
ACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTG
CGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGG
CTCATGAGCGGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGGACTGTTG
GGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTA
CTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGC
CTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGA
CTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCAATTTTCGGCG
AGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCGGTATTCGGAATCTTG
CACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGC
CATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACCGCTGG

25A-S620, pCas9Sp_Rv:

TNNTTCTTATAACTAAAAATATGGTATAATACTCTTAATAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTCAA
GACTGAAGCTAGCTGAGACAAATAGTGCGATTACGAAATTTTTAGACAAAAATAGTCTACGA
GGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAACACAACAATGGCTACACAAATATGTCGT
TTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCCAT
GTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGACTCCATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAGA
GGGTTAATACCAGCAGTCGGATACCTTCCTATTCTTTCTGTAAAGCGTTTTTCATGTTATAATAG
GCAAAAGAAGAGTAGTGATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCT
AGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTT
TGGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGG
CGACCACACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCC
ACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCA
CTTCGGGCTCATGAGCGGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGG
ACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCA
ACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCC
TTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGC

DNA-Sequenz 5'→3': Spacer auf pCas9 mit pCas9Sp_Rv und pCas9Sp_Fw.

ACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATT
 TTCGGCGAGGACCGCTTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCGGTATTTCGG
 AATCTTGACGCCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCGAGAA
 GCAGGCCATTATCGC

oppDBind1, pCas9Sp_Rv:

NTATTTCTTAATAACTAAAAATATGGTATAATACTCTTAATAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTC
 AAGACTGAAGTCTAGCTGAGACAAATAGTGCGATTACGAAATTTTTAGACAAAAATAGTCTAC
 GAGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTATTTTCGCGTAATGTTTCAGAAAATG
 TTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCCAT
 GTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGACTCCATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAGA
 GGGTTAATACCAGCAGTCGGATACCTTCCTATTCTTTCTGTTAAAGCGTTTTTCATGTTATAATAG
 GCAAAAGAAGAGTAGTGTGATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCT
 AGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTT
 TGGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGG
 CGACCACACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGGCGCC
 ACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCA
 CTTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGGA
 CTGTTGGGCGCCATCTCCTTGATGCACCATTCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAA
 CCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTT
 GAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCAC
 TTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTT
 CGGCGAGGACCGCTTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCGGTATTTCGGAA
 TCTTGACGCCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCGAAAAA
 GCAGGCC

Tabelle 85: Sequenzen der Plasmidisolat zur Herstellung von pTRCas9.25A.

DNA-Sequenz 5'→3': Herstellung des pTRCas9.25A mit pUCM13-52 und pUCM13-rev-157.

B3T, pUCM13-52:

GACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTCCTGGGGATCCGTCGACCTGCAGATCACACTACTC
 TTCTTTTGCCTATTATAACATGAAAACGCTTTAACAGAAAGAATAGGAAGGTATCCGACTGCTG
 GTATTAACCCTCTTTCTCAAGTTATCATCGGCAATGTTGAATGGAGTCCATTCAAAACAGCATAG
 CTCTAAAACATGGAACCTCAACAAGTCTCAGTGTGCTGAAGTTTTGGGACCATTCAAAACAGCAT
 AGCTCTAAAACGACATATTTGTGTAGCCATTGTTGTGTTTTGGGACCATTCAAAACAGCATAGC
 TCTAAAACCTCGTAGACTATTTTTGTCTAAAAAATTCGTAATCGCACTATTTGTCTCAGCTAGA
 CTTTCAGTCTTGAAAAGCCCCTGTATTACTGCATTTATTAAGAGTATTATAACCATATTTTATGTTAT
 TAAGAAATAATCTTCATCTAAAATATACTTCAGTCACCTCCTAGCTGACTCAAATCAATGCGTGT
 TTCATAAAGACCAGTGATGGATTGATGGATAAGAGTGGCATCTAAACTTCTTTTGTAGACGTA
 TATCGTTTACGATCAATTGTTGTATCAAAATATTTAAAGCAGCGGGAGCTCCAAGATTCGTCAA

DNA-Sequenz 5'→3': Herstellung des pTRCas9.25A mit pUCM13-52 und pUCM13-rev-157.

CGTAAATAAATGAATAATATTTTCTGCTTGTTACGTATTGGTTTGTCTCTATGTTTGTTATATGC
 ACTAAGAACTTTATCTAAATTGGCATCTGCTAAAATAACACGCTTAGAAAAATTCAGTATTTGCT
 CAATAATCTCATCTAGATAATGCTTATGCTGCTCCACAAACAATTGTTTTGTTTCGTTATCTTCTG
 GACTACCCTTCAACTTTTCATAATGACTAGCTAAATATAAAAAATTCACATATTTGCTTGGCAGA
 GCCAGCTCATTTCTTTTTGTAATTCTCCGGCACTAGCCAGCATCCGTTTACGACCGTTTTCTA
 ACTCAAAAAGACTATATTTAGGTAGTTTAATGATTAAGTCTTTTTTAACTTCCTTATATCCTTTAG
 CTTCTAAAAAGTCAATCGGATTTTTTTCAAGGAAGTCTTTCCATAATTGTGATCCCTAGTAACT
 CTTTAACGGATTTNAACTTCTTCGATTCCCTTTTTTNCNNTTAGCA

B3T, pUCM13-rev-157:

CAGGAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCATCGATATCTAGATCTACGAAATCATCCTGTGG
 AGCTTAGTAGGTTTAGCAAGATGGCAGCGCCTAAATGTAGAATGATAAAAGGATTAAGAGATTA
 ATTTCCCTAAAAATGATAAAACAAGCGTTTTGAAAGCGCTTGTTTTTTGGTTTGCAGTCAGAGT
 AGAATAGAAGTATCAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGC
 CTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTTGAATGGTTCCAACAAGATTATTTTATAACTTTTATAACAA
 ATAATCAAGGAGAAATTCAAAGAAATTTATCAGCCATAAAACAATACTTAATACTATAGAATGAT
 AACAAAATAAACTACTTTTTAAAAGAATTTGTGTTATAATCTATTTATTATTAAGTATTGGGTAAT
 ATTTTTTTGAAGAGATATTTTGAAAAAGAAAAATTAAAGCATATTAACTAATTTTCGGAGGTCATTA
 AAATATTATTGAAATCATCAAACTCATTATGGATTTAATTTAACTTTTTATTTTAGGAGGCAAA
 AATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAATAGCGTCGGATGGGCGGTGAT
 CACTGATGAATATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCACAGT
 ATCAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGACAGTGGAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTC
 TCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTCCGAAGAATCGTATTTGTTATCTACAGGAGAT
 TTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTTGG
 TGAAGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTTGGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTA
 TCATGAGAAATATCCAATCTATCATCTGCGAAAAAATTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGG
 ATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAGTTTCGTGGTCATTTTTTGATTGAG
 GGAGATTTAAATCCTGATAATAGTGATGTGGACAATTTATCCAGTTGGTACAAACCTACAAT
 CAATTATTTGAAAAAACCTATTAACGCAAGTGGA

T9, pUCM13-52:

NCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTCCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGATCACCAC
 TACTCTTCTTTTGCCTATTATAACATGAAAACGCTTTAACAGAAAGAATAGGAAGGTATCCGACT
 GCTGGTATTAACCTCTTTCTCAAGTTATCATCGGCAATGTTGAATGGAGTCCATTCAAAACAG
 CATAGCTCTAAAACATGGAAGTCAACAAGTCTCAGTGTGCTGAAGTTTTGGGACCATTCAAAAC
 AGCATAGCTCTAAAACGACATATTTGTGTAGCCATTGTTGTGTTTTGGGACCATTCAAAACAGC
 ATAGCTCTAAAACCTCGTAGACTATTTTTGTCTAAAAAATTCGTAATCGCACTATTTGTCTCAG
 CTAGACTTCAGTCTTGAAAAGCCCCTGTATTACTGCATTTATTAAGAGTATTATACCATATTTTA
 GTTATTAAGAAATAATCTTCATCTAAAATATACTTCAGTCACCTCCTAGCTGACTCAAATCAATG
 CGTGTTTCATAAAGACCAGTGATGGATTGATGGATAAGAGTGGCATCTAAAACCTCTTTTGTAG

DNA-Sequenz 5'→3': Herstellung des pTRCas9.25A mit pUCM13-52 und pUCM13-rev-157.

ACGTATATCGTTTACGATCAATTGTTGTATCAAATATTTAAAAGCAGCGGGAGCTCCAAGATTC
 GTC AACGTAAATAAATGAATAATATTTTCTGCTTGTTACGTATTGGTTTGTCTCTATGTTTGTTA
 TATGCACTAAGAACTTTATCTAAATTGGCATCTGCTAAAATAACACGCTTAGAAAATTCAGTGAT
 TTGCTCAATAATCTCATCTAAATAATGCTTATGCTGCTCCACAAACAATTGTTTTTGTTCGTTATC
 TTCTGGACTACCCTTCAACTTTTCATAATGACTAGCTAAATATAAAAAATTCACATATTTGCTTGG
 CAGAGCCAGCTCATTTCTTTTTGTAATTCTCCGGCACTAGCCAGCATCCGTTTACGACCGTTT
 TCTAACTCAAAAAGACTATATTTAGGTAGTTTAATGATTAAGTCTTTTTTAACTTCCTTATATCCTT
 TAGCTTCTAAAAAGTCAATCGGATTTTTTTCAAAGGAACCTCTTTCCATAATTGTGATCCCTAGT
 AACTCTTTAACGGATTTAACTTCTTCGATTTCCCTTTTTCCACCTTAGCACCAGTACTAGGACTGAAT
 AAGCTACCGTTGGACTTTCAAAC

T9, pUCM13-rev-157:

ACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCATCGATATCTAGATCTACGAAATCATCCTGTG
 GAGCTTAGTAGGTTTAGCAAGATGGCAGCGCCTAAATGTAGAATGATAAAAGGATTAAGAGATT
 AATTTCCCTAAAAATGATAAAACAAGCGTTTTGAAAGCGCTTGTTTTTTGGTTTGCAGTCAGAG
 TAGAATAGAAGTATCAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAG
 CCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTTGAATGGTTCCAACAAGATTATTTTATAACTTTTATAACA
 AATAATCAAGGAGAAATTCAAAGAAATTTATCAGCCATAAAACAATACTTAATACTATAGAATGA
 TAACAAAATAAACTACTTTTTTAAAGAATTTTGTGTTATAATCTATTTATTATTAAGTATTGGGTAA
 TATTTTTTGAAGAGATATTTTGAAAAAGAAAAATTAAGCATATTAACTAATTCGGAGGTCATT
 AAACTATTATTGAAATCATCAAACTCATTATGGATTTAATTTAACTTTTTATTTTAGGAGGCAA
 AAATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAATAGCGTCGGATGGGCGGTGA
 TCACTGATGAATATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCACAG
 TATCAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGACAGTGGAGAGACAGCGGAAGCGACTCGT
 CTCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAAGAATCGTATTTGTTATCTACAGGAG
 ATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTT
 GGTGGAAGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTTGGAATATAGTAGATGAAGTTGCT
 TATCATGAGAAATATCCAATCTATCATCTGCGAAAAAATTGGTAGATTCTACTGATAAAGC
 GGATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAGTTTCGTGGCATTGTTTATTGAG
 GGAGATTAAATCCTGATAATAGTGATGTGGACAACCTATTTATCCAGTTGGTACAACCTACATTCA
 TT

Tabelle 86: Sequenz des B9 und B10 Screenings der CRISPR-Cas9 Kasette ohne *Spacer* auf pTRKH2. Bei beiden Sequenzen handelt es sich um eine Wiederholung der Sequenzierung von MicroSynth.

DNA-Sequenz 5'→3': Klon B9 und B10 CRISPR-Cas9 Kasette ohne *Spacer* auf pTRKH2 mit pUCM13-52.

B9:

NCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATCCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGTGC
 TTCGAGGATTTTCATTGGAGTTCAGGGTAAACCGCGTGGAACACCTTCTGCCAGGTTACGGCC

DNA-Sequenz 5'→3': Klon B9 und B10 CRISPR-Cas9 Kasette ohne *Spacer* auf pTRKH2 mit pUCM13-52.

ACGAACTTCGATTTACGGACTTCATCGCCCGGATAAGCCGAACCGATTTCTGTGCTTGATACG
TTCTGCGGTGGCTTCACCGATCAGAGAACCCTAATTACGACGCACATAGTTGATGATAGCTTC
GTCGAAACGGTCACCACCAATGCGCACAGAAGAGGAGTAAACCACACCGTTCAAGGAGATAAC
AGCAACTTCAGTGGTACCACCACCGATATCAACCACCATAGAACCGGTGCTTCAGAAACCGG
CAGGCCAGCACCAATTGCGGCAGCCATCGGTTCTTCAATCAGGAAGACTTCACGGGCACCAG
CGCCCTGCGCGGATTCACGAATTGCGCGGCGTTCAACCTGGGTGCGGCCAACCGGCACACAA
ACCAGAACGCGCGGGCTTGACGCATAAAGCTGTTGCTGTGCACTTGTTTGATGAAGTGCTGG
AGCATTTTTTCAGTCACGAAGAAGTCGGCGATAACGCCGTCTTTCATTGGGCGAATGGCAGCA
ATATTGCCCGGCGTACGGCCAGCATCTGCTTCGCGTCATGACCTACTGCAGCCAAGCTTTTCG
CGAGCTCGAGATCTCGAGCTCGCGAAAGCTTGGCTGCAGATCACACTACTCTTCTTTTGCCTA
TTATAACATGAAAACGCTTTAACAGAAAGAATAGGAAGGTATCCGACTGCTGGTATTAACCCTC
TTTCTCAAGTTATCATCGGCAATGTTGAATGGAGTCCATTCAAACAGCATAGCTCTAAACATG
GAACTCAACAAGTCTCAGTGTGCTGAAGTTTTGGGACCATTCAAACAGCATAGCTCTAAACG
AGACCTTTGAGCTTCCGAGACTGGTCTCAGTTTTGGGACCATTCAAACAGCATAGCTCTAAAA
CCTCGTAGACTATTTTTGTCTAAAAAATTTTCGTAATCGCACTATTTGTCTCAGCTAGACTTCAGT
CTTGAAAAGCCCCTGTATTACTGCATT

B10:

CCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTCCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGTGCT
TCGAGGATTTTCATTGGAGTTCAGGGTAAAACCGCGTGGAACACCTTCTGCCAGGTTACGGCCA
CGAACTTCGATTTACGGACTTCATCGCCCGGATAAGCCGAACCGATTTCTGTGCTTGATACGTT
CTGCGGTGGCTTCACCGATCAGAGAACCCTAATTACGACGCACATAGTTGATGATAGCTTCGT
CGAAACGGTCACCACCAATGCGCACAGAAGAGGAGTAAACCACACCGTTCAAGGAGATAACA
GCAACTTCAGTGGTACCACCACCGATATCAACCACCATAGAACCGGTGCTTCAGAAACCGGC
AGGCCAGCACCAATTGCGGCAGCCATCGGTTCTTCAATCAGGAAGACTTCACGGGCACCAGC
GCCCTGCGCGGATTCACGAATTGCGCGGCGTTCAACCTGGGTGCGGCCAACCGGCACACAAA
CCAGAACGCGCGGGCTTGACGCATAAAGCTGTTGCTGTGCACTTGTTTGATGAAGTGCTGGA
GCATTTTTTCAGTCACGAAGAAGTCGGCGATAACGCCGTCTTTCATTGGGCGAATGGCAGCAA
TATTGCCCGGCGTACGGCCAGCATCTGCTTCGCGTCATGACCTACTGCAGCCAAGCTTTTCG
GAGCTCGAGATCTCGAGCTCGCGAAAGCTTGGCTGCAGATCACACTACTCTTCTTTTGCCTATT
ATAACATGAAAACGCTTTAACAGAAAGAATAGGAAGGTATCCGACTGCTGGTATTAACCCTCTT
TCTCAAGTTATCATCGGCAATGTTGAATGGAGTCCATTCAAACAGCATAGCTCTAAACATGG
AACTCAACAAGTCTCAGTGTGCTGAAGTTTTGGGACCATTCAAACAGCATAGCTCTAAACGA
GACCTTTGAGCTTCCGAGACTGGTCTCAGTTTTGGGACCATTCAAACAGCATAGCTCTAAAC
CTCGTAGACTATTTTTGTCTAAAAAATTTTCGTAATCGCACTATTTGTCTCAGCTAGACTTCAGT
TTGAAAAGCCCCTGTTNACTGCATTTATTAAGAGATTATACCATATTTTTAGTATTAAGA

Tabelle 87: Sequenz der Herstellung von pTRCas9 aus pTRCas9PstI.

DNA-Sequenz 5'→3': pTRCas9 Entfernung von <i>E. coli</i> DNA mit pUCM13-52.
CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGATCACACTACT CTTCTTTTGCCTATTATAACATGAAAACGCTTTAACAGAAAGAATAGGAAGGTATCCGACTGCT GGTATTAACCCTCTTTCTCAAGTTATCATCGGCAATGTTGAATGGAGTCCATTCAAAACAGCATA GCTCTAAAACATGGAACCTCAACAAGTCTCAGTGTGCTGAAGTTTTGGGACCATTCAAAACAGCA TAGCTCTAAAACGAGACCTTTGAGCTTCCGAGACTGGTCTCAGTTTTGGGACCATTCAAAACAG CATAGCTCTAAAACCTCGTAGACTATTTTTGTCTAAAAAATTTTCGTAATCGCACTATTTGTCTCA GCTAGACTTCAGTCTTGAAAAGCCCCTGTATTACTGCATTTATTAAGAGTATTATACCATATTTTT AGTTATTAAGAAATAATCTTCATCTAAAATATACTTCAGTCACCTCCTAGCTGACTCAAATCAAT GCGTGTTTCATAAAGACCAGTGATGGATTGATGGATAAGAGTGGCATCTAAACTTCTTTTGTA GACGTATATCGTTTACGATCAATTGTTGTATCAAAATATTTAAAAGCAGCGGGAGCTCCAAGATT CGTCAACGTAAATAAATGAATAATTTTTCTGCTTGTTTCACGTATTGGTTTGTCTCTATGTTTGT ATATGCACTAAGAACTTTATCTAAATTGGCATCTGCTAAAATAACACGCTTAGAAAATTCAGTGA TTTGCTCAATAATCTCATCTAAATAATGCTTATGCTGCTCCACAAACAATTGTTTTTGTTCGTTAT CTTCTGGACTACCCTTCAACTTTTCATAATGACTAGCTAAATATAAAAAATTCACATATTTGCTTG GCAGAGCCAGCTCATTTCTTTTTGTAATTCTCCGGCACTAGCCAGCATCCGTTTACGACCGTT TTCTAACTCAAAAAGACTATATTTAGGTAGTTTAATGATTAAGTCTTTTTTAACCTCCTTATATCCT TTAGCTTCTAAAAGTCAATCGGATTTTTTTCAAAGGAACTTCTTTCCATAATTGTGATCCCTAGT AACTCTTTAACGGATTTTAACTTCTTCGATTTCCCTTTTTCCCCTTAGCACCAGTAGGACTGAAT AAGCTACCGTTGGACTATCAAACC

Tabelle 88: Sequenz der *Spacer* CodY3, CodYLR und oppDBind2 auf pTRCas9. Unterstrichen die *Spacer*-Sequenz.

DNA-Sequenz 5'→3': <i>Spacer</i> auf pTRCas9 klonieren mit pCas9Sp_Rv.
codY3: NNATATGGTATAATACTCTTAATAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTCAAGACTGAAGTCTAGCT GAGACAAATAGTGCGATTACGAAATTTTTAGACAAAAATAGTCTACGAGGTTTTAGAGCTATG CTGTTTTGAATGGTCCCAAAAC <u>CCATACAACAGTATGACTGAACGCT</u> GTTTTAGAGCTATGCTG TTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCCATGTTTTAGAGCTATGCT GTTTTGAATGGACTCCATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAGAGGGTTAATACCAGCAG TCGGATACCTTCCTATTCTTTCTGTTAAAGCGTTTTTCATGTTATAATAGGCCAAAAGAAGAGTAGT GTGATCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG GGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCGACACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCG TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAAT GCTAGAATCGATACGATTTTGAAGTGGCAACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAAATTGTTGCTGA ACTTTTAAAACAAGCAAATACAATCATTGTCGCAACAGATAGCGACAGAGAAGGCGAAAACATT GCCTGGTCGATCATTCATAAAGCAAATGCCTTTTCTAAAGATAAAACGTATAAAAGACTATGGAT CAATAGTTTAGAAAAAGATGTGATCCGTAGCGGTTTTCAAATTTGCAACCAGGAATGAATTACT ATCCCTTTTATCAAGAAGCGCACAAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAAA GATATAATGGGAGATAAGACGGTTCGTGTTGCTGCTGACTTGCACCATATCATAAAAAATCGAAA

DNA-Sequenz 5'→3': Spacer auf pTRCas9 klonieren mit pCas9Sp_Rv.

CAGCAAAGAATGGCGGAAACGTAAAAGAAGTTATGGAAATAAGACTTAGAAGCAAACCTTAAGA
GTGTGTTGATAGTGACGTATCTTAAAATTTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAA
AAATTTGTAATTAAGAAGGAGTGATTACATGAACAAAAATATAAAATATTCTCAAAACTTTTTAAC
GA

oppDBind2:

TATGGTATAATACTCTTAATAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTCAAGACTGAAGTCTAGCTGA
GACAAATAGTGCGATTACGAAATTTTTAGACAAAAATAGTCTACGAGGTTTTAGAGCTATGCTG
TTTTGAATGGTCCCAAACATTTTCTGAACATTACGCGAAATAAGTTTTAGAGCTATGCTGTTTT
GAATGGTCCCAAACCTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCCATGTTTTAGAGCTATGCTGTT
TTGAATGGACTCCATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAGAGGGTTAATACCAGCAGTCG
GATACCTTCCTATTCTTTCTGTTAAAGCGTTTTCATGTTATAATAGGCAAAGAAGAGTAGTGTG
ATCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAA
TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCT
AGAATCGATACGATTTTGAAGTGGCAACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAAATTGTTGCTGAACTT
TTAAAACAAGCAAATACAATCATTGTCGCAACAGATAGCGACAGAGAAGGCGAAAACATTGCCT
GGTCGATCATTCTATAAGCAAATGCCTTTTCTAAAGATAAAACGTATAAAAGACTATGGATCAAT
AGTTTAGAAAAAGATGTGATCCGTAGCGGTTTTCAAATTTGCAACCAGGAATGAATTACTATC
CCTTTTATCAAGAAGCGCACAAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAAAGAT
ATAATGGGAGATAAGACGGTTCGTGTTCTGTGCTGACTTGACCATATCATAAAATCGAAACAG
CAAAGAATGGCGGAAACGTAAAAGAAGTTATGGAAATAAGACTTAGAAGCAAACCTTAAGAGTGT
GTTGATAGTGACGTATCTTAAAATTTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATT
TGTAATTAAG

codYLR:

ANAATATGGTATAATACTCTTAATAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTCAAGACTGAAGTCTAGC
TGAGACAAATAGTGCGATTACGAAATTTTTAGACAAAAATAGTCTACGAGGTTTTAGAGCTATG
CTGTTTTGAATGGTCCCAAACTCGGTCACTCCATCTTGCAAATCGGTTTTAGAGCTATGCTG
TTTTGAATGGTCCCAAACCTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCCATGTTTTAGAGCTATGCT
GTTTTGAATGGACTCCATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAGAGGGTTAATACCAGCAG
TCGGATACCTTCCTATTCTTTCTGTTAAAGCGTTTTCATGTTATAATAGGCAAAGAAGAGTAGT
GTGATCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCG
TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAAT
GCTAGAATCGATACGATTTTGAAGTGGCAACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAAATTGTTGCTGA
ACTTTTAAAACAAGCAAATACAATCATTGTCGCAACAGATAGCGACAGAGAAGGCGAAAACATT
GCCTGGTCGATCATTCTATAAGCAAATGCCTTTTCTAAAGATAAAACGTATAAAAGACTATGGAT
CAATAGTTTAGAAAAAGATGTGATCCGTAGCGGTTTTCAAATTTGCAACCAGGAATGAATTACT
ATCCCTTTTATCAAGAAGCGCACAAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAA
GATATAATGGGAGATAAGACGGTTCGTGTTCTGTGCTGACTTGACCATATCATAAAAAATCGAAA

DNA-Sequenz 5'→3': Spacer auf pTRCas9 klonieren mit pCas9Sp_Rv.

CAGCAAAGAATGGCGGAAACGTAAAAGAAGTTATGGAAATAAGACTTAGAAGCAAACCTTAAGA
 GTGTGTTGATAGTGACGTATCTTAAAATTTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAA
 AAATTTGTAATTAAGAAGGAGTGATTACATGAACAAAAATATAAAATATTCTCAAAACCTTTTAAAC
 GAGTGAAAAAGTACTCACCAATAATAAAACAATTGAATTTAAAGGAACCGATACCGTTTACGA
 AATTGGAANGG

Tabelle 89: Sequenz des Reparatur-Templates auf pTRCas9.25A. Unterstrichen die Sequenz des Reparatur-Templates.

DNA-Sequenz 5'→3': Sequenz Reparaturtemplate auf pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop mit Rep_Test_Fw.

pTRCas9.25AGly:

TGTTAAGCGTTTTTCATGTTATAATAGGCAAAAGAAGAGTAGTGTGATCTGCAGGTCGACTCTGG
TCAACGCAAAACAACAATGGCTACACAAATATGTCTAATACGGGTATGGCCTCGCCATTTATTG
CCGGTTCACAACGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAATCGA
 TACGATTTTGAAGTGGAACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAATTGTTGCTGAACTTTTAAACA
 AGCAAATACAATCATTGTCGCAACAGATAGCGACAGAGAAGGCGAAAACATTGCCTGGTCGAT
 CATTCTATAAGCAAATGCCTTTTCTAAAGATAAAACGTATAAAAGACTATGGATCAATAGTTTAG
 AAAAGATGTGATCCGTAGCGGTTTTCAAAATTTGCAACCAGGAATGAATTACTATCCCTTTTAT
 CAAGAAGCGCACAAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAAGATATAATGGG
 AGATAAGACGGTTCGTGTTCTGTGCTGACTTGACCATATCATAAAAATCGAAACAGCAAAGAAT
 GGCGGAAACGTAAAAGAAGTTATGGAAATAAGACTTAGAAGCAAACCTTAAGAGTGTGTTGATAG
 TGCAGTATCTTAAAATTTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTA
 AGAAGGAGTGATTACATGAACAAAAATATAAAATATTCTCAAAACCTTTTAAACGAGTGAAAAAGT
 ACTCAACCAAATAATAAAACAATTGAATTTAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTGGAACAG
 GTAAAGGGCATTTAACGACGAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTAGA
 CAGTCATCTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTAAACTGAATACTCGTGTCACTTTAATTCACC
 AAGATATTCTACAGTTTCAATTCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTGTTGGGAGTATTCCTTAC
 CATTTAAGCACACAAATTATTAATAAAAGTGTTTTTGAAGCCATGCGTCTGACATCTATCTGAT
 TGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGAC
 CCTCAAGTCTCGATTGAGCATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTC

pTRCas9.25AStop:

TGTTAAGCGTTTTTCATGTTATAATAGGCAAAAGAAGAGTAGTGTGATCTGCAGGTCGACTCTGG
TCAACGCAAAACAACAATGGCTACACAAATATGTAATAAACGTCAATGGCCTCGCCATTTATTG
CCGGTTCACAACGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAATCGA
 TACGATTTTGAAGTGGAACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAATTGTTGCTGAACTTTTAAACA
 AGCAAATACAATCATTGTCGCAACAGATAGCGACAGAGAAGGCGAAAACATTGCCTGGTCGAT
 CATTCTATAAGCAAATGCCTTTTCTAAAGATAAAACGTATAAAAGACTATGGATCAATAGTTTAG
 AAAAGATGTGATCCGTAGCGGTTTTCAAAATTTGCAACCAGGAATGAATTACTATCCCTTTTAT
 CAAGAAGCGCACAAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAAGATATAATGGG

DNA-Sequenz 5'→3': Sequenz Reparaturtemplate auf pTRCas9.25AGly und pTRCas9.25AStop mit Rep_Test_Fw.

AGATAAGACGGTTCGTGTTTCGTGCTGACTTGCACCATATCATAAAAATCGAAACAGCAAAGAAT
 GGCGGAAACGTAAAAGAAGTTATGGAAATAAGACTTAGAAGCAAACCTTAAGAGTGTGTTGATAG
 TGCAGTATCTTAAAAATTTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTA
 AGAAGGAGTGATTACATGAACAAAAATATAAAATATTCTCAAAACTTTTTAACGAGTGAAAAAGT
 ACTCAACCAAATAATAAAACAATTGAATTTAAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTGGAACAG
 GTAAAGGGCATTTAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTAGA
 CAGTCATCTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTAAACTGAATACTCGTGTCACTTTAATTCACC
 AAGATATTCTACAGTTTCAATTCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTGTTGGGAGTATTCCTTAC
 CATTTAAGCACACAAATTATTAATAAAAGTGGTTTTTGAAAGCCATGCGTCTGACATCTATCTGAT
 TGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGCAC
 ACTCAAGTCTCGATTACGAATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAAACCAAAG
 TA

Tabelle 90: Sequenz der Amplifikation des Xylose Promotors von *L. lactis* LTH 3882 mit Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix

DNA-Sequenz 5'→3': Xylose Promotor des *L. lactis* LTH 3882 mit A51.

A51:

GATGTTGTCGTTGGTGCTGGCTCTGTGGTGACCAAATCATTTCTAGCCACTGCATAATTGCTG
 GAAATCCGGCACGCTTAATAAAAAATGAATAAACTAATTAAACTGCTCTTACATAAGAGTAGTT
 TTTAGCTTTATTATGAGCAACATTTCCATTTTAAATATCAAGGATTACAAGAAAGTAAGTGTGG
 AAAGCGGTATCATTTGTGGGTAGTAAAAAAGGCAAGAAGACTTGCAAATAAAAATTAAGGAGTT
 ACTATTATGAGAAAACCTTCTCCCACTTTTCATCTATTTTTTTGGTGCTTTAGGTGGCTTATTATTT
 GGATATGACACAGGCGTCATATCGGGAGCGCTACTTTTTATTGAAAAAGAGAGCTGGCAGGTG
 AGTTCTTGGGCTTGGATGGAAGGATGGATTACAGCGGCAGTTTTAATGGGAGCTGTAATTGGC
 GCGGTCGTAATTGGACCAATGAGTGACCGTTTTTGGTCAATTAC

Tabelle 91: Sequenz der Amplifikation des *recT*-Gens von *E. faecalis* ATCC14506 mit Q5® High-Fidelity-Polymerase.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat von *recT* mit RBS_recT_Fw und XbaI_RecT_Rev.

RBS_recT_Fw:

ATATGACAAAGAAGAGGAGAATGACAATGAGTAATGATTTAACACAGGTGACACAACGATCTTT
 AGATGAACAAGTCATCGGAAATTTAAATAGATTGCAAGAGCAGGGATTAGAAATGCCACCAGG
 CTATAGCCCGCAGAATGCATTGAAAAGTGCTTTCTTTGAACTAACCAACAATTCAGGAGGAAAC
 CTTCTTCAGTTGGCAGCTAACAACCCTGAACTAAAACATCTATTTCTAACGCGTTACTAGATAT
 GGTCATCCAAGGATTATCACCAGCAAAAAACAATGTTATTTTATCAAGTATGGAAATAAAGTCC
 AGCTTATGCGCTCATATTTTGAACCATGGCTGTATTAGATCGAGTAACAGGAGGTGCAGAGAT
 CACGCCTGTTGTAGTAAGAGAAGGCGATGTATTTGAAATTGCTATGGACGGGCCCGACTTAGT
 TGTGGCTAAACATGAAACATCCTTCGAAAACCTAGACAACGACATCAAGGCTGCTTATGTGGTT

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat von recT mit RBS_recT_Fw und XbaI_RecT_Rev.
ATTAAGCTAGCAAATGGTAAAGAAGTAACAACGGTCATGACAAAGAAACAAATTGATAAGTCAT GGAGTAAAGCAAAAACAAAAATGTTCAAAACGATTTCCCAGAAGAAATGGCAAAAAGAACTGT CATCAATCGAGCTGCTAAATATTTAATCAATACTAGTAACGATAATGATTTATTTGTGCAAGCTG CTAAGACACACTCGAAAATGAATTCGAACGAAAAGATGTGACACCAGAGCGAGAAGAGCAAG CTGCCGTACTCGAAGAAAAAATATTTACCAACAATAAAAAAGTTATTGAGCAAGAAAACGATATT GAACAAGCCAAACCAGTTGAAAAAGATGATTTAACGAAAGTGCGGACCAAATTTTAGAAGAAC CAGTTCAGGAACTTTAGATGTGATGGCTGGTTATGAAACCAATCAGAAAGAGAGTGAAGCTG ATGTCTCAACGATTGAAGAAGACGATTATCTTCG
XbaI_RecT_Rev: CAGCTTCACTCTCTTTCTGATTGGTTTCATAACCAGCCATCACATCTAAAGTTTCCTGAACTGGT TCTTCTAAAATTTGGTCCGCCACTTTTCGTTAAATCATCTTTTTCACTGGTTTGGCTTGTTCAATA TCGTTTTCTTGCTCAATAACTTTTTTATTGTTGGTAAATATTTTTCTTCGAGTACGGCAGCTTGC TCTTCTCGCTCTGGTGTACATCTTTTCGTTCAATTCATTTTCGAGTGTGTCTTTAGCAGCTTG CACAAATAAATCATTATCGTTACTAGTATTGATTAAATATTTAGCAGCTCGATTGATGACAGTTCT TTTTGCCATTTCTTCTGGGAAATCGTTTTGAACATTTTTTGTCTTTACTCCATGACTTATC AATTTGTTTCTTTGTCATGACCGTTGTTACTTCTTTACCATTGCTAGCTTAATAACCACATAAGC AGCCTTGATGTCGTTGTCTAGGTTTTCGAAGGATGTTTCATGTTTAGCCACAATAAGTCGGGC CCGTCCATAGCAATTTCAAATACATCGCCTTCTCTTACTACAACAGGCGTGATCTCTGCACCTC CTGTTACTCGATCTAATACAGCCATGGTTCCAAAATATGAGCGCATAAGCTGGACTTTATTTCC ATACTTGATAAAATAACATTGTTTTTTGCTGGTGATAATCCTTGGATGACCATATCTAGTAACG CGTTAGAAATAGATGTTTTAGTTTCAGGGTTGTTAGCTGCCAACTGAAGAAGGTTTCCTCCTGA ATTGTTGGTTAGTTCAAAGAAAGCACTTTTCAATGCATTCTGCGGGCTATAGCCTGGTGGCATT TCTAATCCCTGCTCTTGCAATCTATTTAAATTTCCGATGACTTGTTTCATCTAAAGATCGTTGTGT CACCTGTGTTAAATCATTACTCATTGTCATTCTCTCTTTGTCATATCCCATGTTGGTTCTA ATGCTTCTTTCTCTGGAGGTCTGTCTT

Tabelle 92: Sequenzen der Klone des HiFi-Assemblys zur Herstellung von pNZrecTPG.

DNA-Sequenz 5'→3': Sequenzierung von Plasmidisolat der pNZrecTPG Klone mit Insert_recT_Rv.
PG1: TTAATCGATCTAATACAGCCATGGTTCCAAAATATGAGCGCATAAGCTGGACTTTATTTCCATAC TTGATAAAATAACATTGTTTTTTGCTGGTGATAATCCTTGGATGACCATATCTAGTAACGCGTT AGAAATAGATGTTTTAGTTTCAGGGTTGTTAGCTGCCAACTGAAGAAGGTTTCCTCCTGAATTG TTGGTTAGTTCAAAGAAAGCACTTTTCAATGCATTCTGCGGGCTATAGCCTGGTGGCATTTCTA ATCCCTGCTCTTGCAATCTATTTAAATTTCCGATGACTTGTTTCATCTAAAGATCGTTGTGTACC TGTGTTAAATCATTACTCATGGTGAGTGCCTCCTTATAATTTATTTTGTAGTTCTTTCGAACGAA ATCATTGTATCTAACAACTTCAGAATTTAATCAGAGCCGTTTATTATGCTCGCGGTTATCGAA
PG2: AATACAGCCATGGTTCCAAAATATGAGCGCATAAGCTGGACTTTATTTCCATACTTGATAAAATA

DNA-Sequenz 5'→3': Sequenzierung von Plasmidisolat der pNZrecTPG Klon mit Insert_recT_Rv.

ACATTGTTTTTTGCTGGTGATAATCCTTGGATGACCATATCTAGTAACGCGTTAGAAATAGATG
TTTTAGTTTCAGGGTTGTTAGCTGCCAACTGAAGAAGGTTTCCTCCTGAATTGTTGGTTAGTTCA
AAGAAAGCACTTTTCAATGCATTCTGCGGGCTATAGCCTGGTGGCATTTCCTAATCCCTGCTCTT
GCAATCTATTTAAATTTCCGATGACTTGTTTCATCTAAAGATCGTTGTGTACCTGTGTAAATCA
TTACTCATGGTGAGTGCCTCCTTATAATTTATTTTGTAGTTCCTTCGAACGAAATCATTGTATCTA
ACAAACTTCAGAATTTAATCAGAGCCGTTTATTATGCTCGCCGTTATCGA

PG3:

ATACAGCCATGGTTCCAAAATATGAGCGCATAAGCTGGACTTTATTTCCATACTTGATAAAATAA
CATTGTTTTTTTGGCTGGTGATAATCCTTGGATGACCATATCTAGTAACGCGTTAGAAATAGATGT
TTTAGTTTCAGGGTTGTTAGCTGCCAACTGAAGAAGGTTTCCTCCTGAATTGTTGGTTAGTTCA
AAGAAAGCACTTTTCAATGCATTCTGCGGGCTATAGCCTGGTGGCATTTCCTAATCCCTGCTCTT
GCAATCTATTTAAATTTCCGATGACTTGTTTCATCTAAAGATCGTTGTGTACCTGTGTAAATCA
TTACTCATGGTGAGTGCCTCCTTATAATTTATTTTGTAGTTCCTTCGAACGAAATCATTGTATCTA
ACAAACTTCAGAATTTAATCAGAGCCGTTTATTATGCTCGCGTTATCGAATCC

PG4:

ATACAGCCATGGTTCCAAAATATGAGCGCATAAGCTGGACTTTATTTCCATACTTGATAAAATAA
CATTGTTTTTTTGGCTGGTGATAATCCTTGGATGACCATATCTAGTAACGCGTTAGAAATAGATGT
TTTAGTTTCAGGGTTGTTAGCTGCCAACTGAAGAAGGTTTCCTCCTGAATTGTTGGTTAGTTCA
AAGAAAGCACTTTTCAATGCATTCTGCGGGCTATAGCCTGGTGGCATTTCCTAATCCCTGCTCTT
GCAATCTATTTAAATTTCCGATGACTTGTTTCATCTAAAGATCGTTGTGTACCTGTGTAAATCA
TTACTCATGGTGAGTGCCTCCTTATAATTTATTTTGTAGTTCCTTCGAACGAAATCATTGTATCTA
ACAAACTTCAGAATTTAATCAGAGCCGTTTATTATGCTCGCGTTATCGAAATAC

PG5:

AATACAGCCATGGTTCCAAAATATGAGCGCATAAGCTGGACTTTATTTCCATACTTGATAAAATA
ACATTGTTTTTTTGGCTGGTGATAATCCTTGGATGACCATATCTAGTAACGCGTTAGAAATAGATG
TTTTAGTTTCAGGGTTGTTAGCTGCCAACTGAAGAAGGTTTCCTCCTGAATTGTTGGTTAGTTCA
AAGAAAGCACTTTTCAATGCATTCTGCGGGCTATAGCCTGGTGGCATTTCCTAATCCCTGCTCTT
GCAATCTATTTAAATTTCCGATGACTTGTTTCATCTAAAGATCGTTGTGTACCTGTGTAAATCA
TTACTCATGGTGAGTGCCTCCTTATAATTTATTTTGTAGTTCCTTCGAACGAAATCATTGTATCTA
ACAAACTTCAGAATTTAATCAGAGCCGTTTATTATGCTCGCGTTATCGAAGCA

PG6:

ATACAGCCATGGTTCCAAAATATGAGCGCATAAGCTGGACTTTATTTCCATACTTGATAAAATAA
CATTGTTTTTTTGGCTGGTGATAATCCTTGGATGACCATATCTAGTAACGCGTTAGAAATAGATGT
TTTAGTTTCAGGGTTGTTAGCTGCCAACTGAAGAAGGTTTCCTCCTGAATTGTTGGTTAGTTCA
AAGAAAGCACTTTTCAATGCATTCTGCGGGCTATAGCCTGGTGGCATTTCCTAATCCCTGCTCTT
GCAATCTATTTAAATTTCCGATGACTTGTTTCATCTAAAGATCGTTGTGTACCTGTGTAAATCA
TTACTCATGGTGAGTGCCTCCTTATAATTTATTTTGTAGTTCCTTCGAACGAAATCATTGTATCTA
ACAAACTTCAGAATTTAATCAGAGCCGTTTATTATGCTCGCGTTATCGAGGGG

Tabelle 93: Sequenz der Amplifikation des Xylose-Promotors mittels *Taq* DNA-Polymerase.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat pXylt mit Klonierungsprimern und pXylt_RBS_Fw.
CTTTATTATGAGCAACATTTCCATTTTAAAATATCAAGGATTACAAGAAAGTAAGTGTGGAAAGC GGTATCATTTGTGGGTAGTAAAAAAGGCAAGAAGACTTGCAAATAAAAATTAAGGAGTTCTGCA GTGACTG

Tabelle 94: Sequenzen von pNZrecTGV zur Amplifikation des Xylose Promotors. Unterstrichen die Xylose Promotor Sequenz.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat von pNZrecTGV mit Hifi_Test_pNZ_Fw.
Kolonie 3: NACNGCTCCAGATCTCTATTA AAACTGCTCTTACATAAGAGTAGTTTTTAGCTTTATTATGAGCA ACATTTCCATTTTAAAATATCAAGGATTACAAGAAAGTAAGTGTGGAAAGCGGTATCATTCGTG GGTAGTAAAAAAGGCAAGAAGACTTGCAAATAAAAATTAAGGAGTTCTGCAGAGATGAGTAATG ATTTAACACAGGTGACACAACGATCTTTAGATGAACAAGTCATCGGAAATTTAAATAGATTGCAA GAGCAGGGATTAGAAATGCCACCAGGCTATAGCCCGCAGAATGCATTGAAAAGTGCTTTCTTT GAACTAACCAACAATTCAGGAGGAAACCTTCTTCAGTTGGCAGCTAACAACCCTGAACTAAAA CATCTATTTCTAACGCGTTACTAGATATGGTCATCCAAGGATTATCACCAGCAAAAAACAATGT TATTTTATCAAGTATGGAAATAAAGTCCAGCTTATGCGCTCATATTTTGAACCATGGCTGTATT AGATCGAGTAACAGGAGGTGCAGAGATCACGCCTGTTGTAGTAAGAGAAGGCGATGTATTTGA AATTGCTATGGACGGGCCGACTTAGTTGTGGCTAAACATGAAACATCCTTCGAAAACCTAGAC AACGACATCAAGGCTGCTTATGTGGTTATTAAGCTAGCAAATGGTAAAGAAGTAACAACGGTCA TGACAAAGAAACAAATTGATAAGTCATGGAGTAAAGCAAAAACAAAAATGTTCAAACGATTTT CCAGAAGAAATGGCAAAAAGAACTGTCATCAATCGAGCTGCTAAATATTTAATCAATACTAGTAA CGATAATGATTTATTTGTGCAAGCTGCTAAAGACACACTCGAAAATGAATTCGAACGAAAAGAT GTGACACCAGAGCGAGAAGAGCAAGCTGCCGTACTCGAAGAAAAAATATTTACCAACAATAAA AAAGTTATTGAGCAAGAAAACGATATTGAACAAGCCAAACCAGTTGAAAAAGATGATTTAACGA AAGTGGCGGACCAATTTTAGAAGAACCAGTTCAGGAACTTTAGATGTGATGGCTGGTTATGA AACCAATCAGAAAGAGAGTGAAGCTGATGTCTCAACGATTGAAGAAGACGATTATCCTTTCTGA TCTAGAAAGCTCAAGCTTTCTTTGAACCAAAATTAGAAAACCAAGGCTTGAAACGTTCAATTGAA ATGGGCATTTAACCAA Kolonie 7: AGCTCCAGATCTCTATTA AAACTGCTCTTACATAAGAGTAGTTTTTAGCTTTATTATGAGCAACA TTTCCATTTTAAAATATCAAGGATTACAAGAAAGTAAGTGTGGAAAGCGGTATCATTCGTGGGT AGTAAAAAAGGCAAGAAGACTTGCAAATAAAAATTAAGGAGTTCTGCAGAGATGAGTAATGATT TAACACAGGTGACACAACGATCTTTAGATGAACAAGTCATCGGAAATTTAAATAGATTGCAAGA GCAGGGATTAGAAATGCCACCAGGCTATAGCCCGCAGAATGCATTGAAAAGTGCTTTCTTTGA ACTAACCAACAATTCAGGAGGAAACCTTCTTCAGTTGGCAGCTAACAACCCTGAACTAAAACA TCTATTTCTAACGCGTTACTAGATATGGTCATCCAAGGATTATCACCAGCAAAAAACAATGTTA TTTTATCAAGTATGGAAATAAAGTCCAGCTTATGCGCTCATATTTTGAACCATGGCTGTATTAG ATCGAGTAACAGGAGGTGCAGAGATCACGCCTGTTGTAGTAAGAGAAGGCGATGTATTTGAAA TTGCTATGGACGGGCCGACTTAGTTGTGGCTAAACATGAAACATCCTTCGAAAACCTAGACAA

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat von pNZrecTGV mit Hifi_Test_pNZ_Fw.

CGACATCAAGGCTGCTTATGTGGTTATTAAGCTAGCAAATGGTAAAGAAGTAACAACGGTCATG
 ACAAAGAAACAAATTGATAAGTCATGGAGTAAAGCAAAAACAAAAATGTTCAAAACGATTTCCC
 AGAAGAAATGGCAAAAAGAACTGTCATCAATCGAGCTGCTAAATATTTAATCAATACTAGTAAC
 GATAATGATTTATTTGTGCAAGCTGCTAAAGACACACTCGAAAATGAATTCGAACGAAAAGATG
 TGACACCAGAGCGAGAAGAGCAAGCTGCCGTAAGGAAAAAATATTTACCAACAATAAAAA
 AGTTATTGAGCAAGAAAACGATATTGAACAAGCCAAACCAGTTGAAAAAGATGATTTAACGAAA
 GTGGCGGACCAAATTTTAGAAGAACCAGTTCAGGAACTTTAGATGTGATGGCTGGTTATGAAA
 CCAATCAGAAAGAGAGTGAAGCTGATGTCTCAACGATTGAAGAAGACGATTATCCTTTCTGATC
 TAGAAAGCTCAAGCTTTCTTTGAACCAAATTAGAAAACCAAGGCTTGAAACGTTCAATTGAAAT
 GGCA

Tabelle 95: Sequenz der 16S-rRNA der biologischen Masse nach Konjugation.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat der 16S RNA durch Konjugation mit 616V.

GGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGAGTTTGATTCTGGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGAG
 TTTGATTCTGGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGACTGGATACGGGATCTAATACCGCATAACG
 TCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTA
 GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACC
 AGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
 ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA
 GTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGA
 AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
 GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTC
 AACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC
 GAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGAGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
 GTTAAGTCGACCGGCCTGGGGAAGTACGGCCGCAAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGG
 GGGCCCGCACCAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTTAATTCCATGCCAACGCGAAAGAAACCTTA
 CCTGGGTCTTGACCATCCACGGGAAGTTTTTCAAAGATGGAAAAAAGGTGCCTTTTCGGGAAA
 CCCGTGAAAAACAAGGGGCTTGCATGGNCTGTGCGTCAGCTTCGTGTTTGGGAAATATGGTTG
 GGGGTTAAAGTCCCCCGCAAACGAAAGCGGCAAACCCCTTTA

Tabelle 96: Sequenz der PCR zur Überprüfung der Mutation der potenziell positiven Transformanten von *L. cremoris* LTH 7122.**DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat des *prtP*-Gens zur Mutationskontrolle im *L. cremoris* LTH 7122 mit S620S-MAMAF1.**

Kolonie 1:

GATAGGTTAGTTCATGGGTGCGATTTCGTGAAGGTCAGTTTAAAGGTCTTGTCCGTAAGTCT
 GAAGTCTTTCAATTCAACTGCCGGGTAGCCGTTTTTCGGCGACAACCGTTGACGGATTCTTTTCT

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat des *prtP*-Gens zur Mutationskontrolle im *L. cremoris* LTH 7122 mit S620S-MAMAF1.

AATGCATCAATGGCTGCCTTCACATCAACAAGACCGGCCCTTGCCGCCGCGGCGATACGATA
ACATTATTGTAGTTAATATCGTTGATTGGCTGGGCAGTATTCATCTCAACTGTCTTAAGAAAATC
GGTGAGCGCTGTCCCTTTAAGTTGTTTGTAGTAAGCATAAAATGGGTTGTTTTGTTATTCAATG
CTTGTTTCAACAATGCTTGTGAACCGGCAATAAATGGTGAGGCCATTGACGTACCAGACATATT
TGTGTAGCCATTGTTGTTTTGCGTTGACCAGATGTTGCCGCCTGGTGCGGTAATATCTGGTTTG
AAGGAAAGATTGGAACTGGCCCATAGGATGTGAAGTCAGACATCTTGTCTTCAGTATATTTCT
GATTTGGTACCAGCGTCAGGGCAATCTTGACACCGAGACTATCATCCGGGTGTGCTGCGACCC
AGTCAACCAGCTTTTGACCGGTTACACTGGAGAGCCCAAATGTTGGGAAGGTGGTGGTTAACG
CCATAGAAGTCACCGGTGTTGCTGTGCCATCGTTGTTGACAATGATCAAGCCAGCAGCACCAG
CGGCTTGGGCGTATTTTTGTTTGTGTCAGCAAAGGTAAGTTCGCCACGTTTAACGATGGCAATTTT
GCCTTTAGCGTCAGCAGTATAGTCGGCTACTTTCCCTTTGCTGAGGTTGCCACTAGCATCTTTA
ACAACATAAACTTCTTTTGGTCAAAGCTACCAGTGAAATCGTTGCTTGAAAGTGAAA

Kolonie 5:

CNNAGGTTAGTTCATGGGTGCGATTCTGTAAGGTCAGTTTAAAGGTCTTGTCGGTACTCG
TGAAGTCTTTCAATTCAACTGCCGGGTAGCCGTTTTTCGGCGACAACCGTTGACGGATTCTTTTC
TAATGCATCAATGGCTGCCTTCACATCAACAAGACCGGCCCTTGCCGCCGCGGCGATACGAT
AACATTATTGTAGTTAATATCGTTGATTGGCTGGGCAGTATTCATCTCAACTGTCTTAAGAAAAT
CGGTGAGCGCTGTCCCTTTAAGTTGTTTGTAGTAAGCATAAAATGGGTTGTTTTGTTATTCAAT
GCTTGTTTCAACAATGCTTGTGAACCGGCAATAAATGGTGAGGCCATTGACGTACCAGACATAT
TTGTGTAGCCATTGTTGTTTTGCGTTGACCAGATGTTGCCGCCTGGTGCGGTAATATCTGGTTT
GAAGGAAAGATTGGAACTGGCCCATAGGATGTGAAGTCAGACATCTTGTCTTCAGTATATTTTC
TGATTTGGTACCAGCGTCAGGGCAATCTTGACACCGAGACTATCATCCGGGTGTGCTGCGACC
CAGTCAACCAGCTTTTGACCGGTTACACTGGAGAGCCCAAATGTTGGGAAGGTGGTGGTTAAC
GCCATAGAAGTCACCGGTGTTGCTGTGCCATCGTTGTTGACAATGATCAAGCCAGCAGCACCA
GCGGCTTGGGCGTATTTTTGTTTGTGTCAGCAAAGGTAAGTTCGCCACGTTTAACGATGGCAATTT
TGCCTTTAGCGTCAGCAGTATAGTCGGCTACTTTCCCTTTGCTGAGGTTGCCACTAGCATCTTT
AACAACATAAACTTCTTTTGGTCAAAGCTACCAGTGAAATCGTTGCTTGAAACTGAA

Kolonie 9:

NATTTGATAGGTTAGTTCATGGGTGCGATTCTGTAAGGTCAGTTTAAAGGTCTTGTCGGTA
CTCGTGAAGTCTTTCAATTCAACTGCCGGGTAGCCGTTTTTCGGCGACAACCGTTGACGGATTCT
TTTTCTAATGCATCAATGGCTGCCTTCACATCAACAAGACCGGCCCTTGCCGCCGCGGCGAT
ACGATAACATTATTGTAGTTAATATCGTTGATTGGCTGGGCAGTATTCATCTCAACTGTCTTAAG
AAAATCGGTGAGCGCTGTCCCTTTAAGTTGTTTGTAGTAAGCATAAAATGGGTTGTTTTGTTAT
TCAATGCTTGTTCACAATGCTTGTGAACCGGCAATAAATGGTGAGGCCATTGACGTACCAGA
CATATTTGTGTAGCCATTGTTGTTTTGCGTTGACCAGATGTTGCCGCCTGGTGCGGTAATATCT
GGTTTGAAGGAAAGATTGGAACTGGCCCATAGGATGTGAAGTCAGACATCTTGTCTTCAGTAT
ATTTCTGATTTGGTACCAGCGTCAGGGCAATCTTGACACCGAGACTATCATCCGGGTGTGCTG
CGACCCAGTCAACCAGCTTTTGACCGGTTACACTGGAGAGCCCAAATGTTGGGAAGGTGGTG

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat des *prtP*-Gens zur Mutationskontrolle im *L. cremoris* LTH 7122 mit S620S-MAMAF1.

GTTAACGCCATAGAAGTCACCGGTGTTGCTGTGCCATCGTTGTTGACAATGATCAAGCCAGCA
GCACCAGCGGCTTGGGCGTATTTTTGTTTGTGTCAGCAAAGGTAAGTTCGCCACGTTTAACGATG
GCAATTTTGCCTTTAGCGTCAGCAGTATAGTCGGCTACTTTCCCTTTGCTGAGGTTGCCACTAG
CATCTTTAACAACATAAACTTCTTTTGGTCAAAGCTACCAGTGAAATCGTTGCTTGAAAGTGAA
AGNGGTTTC

Tabelle 97: Sequenz der PCR zur Überprüfung der Mutation von *L. lactis* LTH 7123 des Klons M3X.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat des *prtP*-Gens zur Mutationskontrolle im *L. lactis* LTH 7123 des Klons M3X mit S620S-MAMAF1.

AGTTCATGGGTCGTGCGATTCTGTGAGGTCAGTTTAAGGTCTTGTCCGTACTCGTGAAGTCTTTC
AATTCAACTGCCGGGTAGCCGTTTTTCGGCGACAACCGTTGACGGATTCTTTTCTAATGCATCAA
TGGCTGCCTTCACATCAACAAGACCGGCCCTTGCCGCCGCGGCGATACGATAACATTATTGT
AGTTAATATCGTTGATTGGCTGGGCAGTATTCATCTCAACTGTCTTAAGAAAATCGGTGAGCGC
TGTCCCTTTAAGTTGTTTGTAGTAAGCATAAAATGGGTTGTTTTGTTATTCAATGCTTGTTTCAA
CAATGCTTGTGAACCGGCAATAAATGGTGAGGCCATTGACGTACCAGACATATTTGTGTAGCC
ATTGTTGTTTTGCGTTGACCAGATGTTGCCGCCTGGTGCGGTAATATCTGGTTTGAAGGAAAGA
TTGGAAACTGGCCCATAGGATGTGAAGTCAGACATCTTGCTTCAGTATATTTCTGATTTGGTA
CCAGCGTCAGGGCAATCTTGACACCGAGACTATCATCCGGGTGTGCTGCGACCCAGTCAACC
AGCTTTTGACCGGTTACACTGGAGAGCCCAAATGTTGGGAAGGTGGTGTTAACGCCATAGAA
GTCACCGGTGTTGCTGTGCCATCGTTGTTGACAATGATCAAGCCAGCAGCACCAGCGGCTTGG
GCGTATTTTTGTTTGTGTCAGCAAAGGTAAGTTCGCCACGTTTAACGATGGCAATTTTGCCTTTAG
CGTCAGCAGTATAGTCGGCTACTTTCCCTTTGCTGAGGTTGCCACTAGCATCTTTAACAACATA
AAACTTCTTTTGGTCAAAGCTACCAGTGAAATCGTTGCTTGAAGTGA

Tabelle 98: Sequenz der PCR zur Überprüfung der Mutation des *L. cremoris* LTH 7122 der Klone XM17.1 und XM17.2.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat des *prtP*-Gens zur Mutationskontrolle im *L. cremoris* LTH 7122 der Klone XM17.1 und XM17.2 mit S620S-MAMAF11.

XM17.1:

TTCATGGGTCGTGCGATTCTGTGAAGGTCAGTTTAAGGTCTTGTCCGTACTCGTGAAGTCTTTC
AATTCAACTGCCGGGTAGCCGTTTTTCGGCGACAACCGTTGACGGATTCTTTTCTAATGCATCAA
TGGCTGCCTTCACATCAACAAGACCGGCCCTTGCCGCCGCGGCGATACGATAACATTATTGT
AGTTAATATCGTTGATTGGCTGGGCAGTATTCATCTCAACTGTCTTAAGAAAATCGGTGAGCGC
TGTCCCTTTAAGTTGTTTGTAGTAAGCATAAAATGGGTTGTTTTGTTATTCAATGCTTGTTTCAA
CAATGCTTGTGAACCGGCAATAAATGGTGAGGCCATTGACGTACCAGACATATTTGTGTAGCC
ATTGTTGTTTTGCGTTGACCAGATGTTGCCGCCTGGTGCGGTAATATCTGGTTTGAAGGAAAGA
TTGGAAACTGGCCCATAGGATGTGAAGTCAGACATCTTGCTTCAGTATATTTCTGATTTGGTA

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat des *prtP*-Gens zur Mutationskontrolle im *L. cremoris* LTH 7122 der Klone XM17.1 und XM17.2 mit S620S-MAMAF11.

CCAGCGTCAGGGCAATCTTGACACCGAGACTATCATCCGGGTGTGCTGCGACCCAGTCAACC
AGCTTTTGACCGGTTACACTGGAGAGCCCCAAATGTTGGGAAGGTGGTGGTTAACGCCATAGAA
GTCACCGGTGTTGCTGTGCCATCGTTGTTGACAATGATCAAGCCAGCAGCACCAGCGGCTTGG
GCGTATTTTTGTTTGTGAGCAAAGGTAAGTTCGCCACGTTTAACGATGGCAATTTGCCTTTAG
CGTCAGCAGTATAGTCGGCTACTTTCCCTTTGCTGAGGTTGCCACTAGCATCTTTAAACAACATA
AAACTTCTTTTGGTCAAAGCTACCAGTGAAATCGTTGCTTGAAAGCTGAAATGGTTTCCA

XM17.2:

TTCATGGGTCGTGCGATTCTGTGAAGGTCAGTTTAAAGGTCTTGTCCGTAAGTCTTTC
AATTCAACTGCCGGGTAGCCGTTTTCGGCGACAACCGTTGACGATTCTTTTCTAATGCATCAA
TGGCTGCCTTCACATCAACAAGACCGGCCCTTGCCGCCGCGGCGATACGATAACATTATTGT
AGTTAATATCGTTGATTGGCTGGGCAGTATTCATCTCAACTGTCTTAAGAAAATCGGTGAGCGC
TGTCCCTTTAAGTTGTTTGTAGTAAGCATAAAATGGGTTGTTTTTGTATTCAATGCTTGTTTCAA
CAATGCTTGTGAACCGGCAATAAATGGTGAGGCCATTGACGTACCAGACATATTTGTGTAGCC
ATTGTTGTTTTGCGTTGACCAGATGTTGCCGCTGGTGCGGTAATATCTGGTTTGAAGGAAAGA
TTGGAACTGGCCCATAGGATGTGAAGTCAGACATCTTGTCTTCAGTATATTTCTGATTTGGTA
CCAGCGTCAGGGCAATCTTGACACCGAGACTATCATCCGGGTGTGCTGCGACCCAGTCAACC
AGCTTTTGACCGGTTACACTGGAGAGCCCCAAATGTTGGGAAGGTGGTGGTTAACGCCATAGAA
GTCACCGGTGTTGCTGTGCCATCGTTGTTGACAATGATCAAGCCAGCAGCACCAGCGGCTTGG
GCGTATTTTTGTTTGTGAGCAAAGGTAAGTTCGCCACGTTTAACGATGGCAATTTGCCTTTAG
CGTCAGCAGTATAGTCGGCTACTTTCCCTTTGCTGAGGTTGCCACTAGCATCTTTAAACAACATA
AAACTTCTTTTGGTCAAAGCTACCAGTGAAATCGTTGCTTGAAAGCTGAATGGTTTCCNA

Tabelle 99: Sequenz der PCR zur Überprüfung der Mutation von *L. cremoris* LTH 7122 der Klone 8.11 und 27.11.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat des *prtP*-Gens zur Mutationskontrolle im *L. cremoris* LTH 7122 der Klone 8.11 und 27.11 mit S620S-MAMAR oder S620S-MAMAF11.

8.11 mit S620S-MAMAR:

NNNTTTTATGTTGTTAAAGATGCTAGTGGCAACCTCAGCAAAGGGAAAGTAGCCGACTATACTG
CTGACGCTAAAGGCCAAAATTGCCATCGTTAAACGTGGCGAACTTACCTTTGCTGACAAACAAAA
ATACGCCCAAGCCGCTGGTGCTGCTGGCTTGATCATTGTCAACAACGATGGCACAGCAACACC
GGTGACTTCTATGGCGTTAACCACCACCTTCCCAACATTTGGGCTCTCCAGTGTAACCGGTCA
AAAGCTGGTTGACTGGGTGCGCAGCACACCCGGATGATAGTCTCGGTGTCAAGATTGCCCTGAC
GCTGGTACCAAATCAGAAATATACTGAAGACAAGATGTCTGACTTCACATCCTATGGGCCAGTT
TCCAATCTTTCTTCAAACCAGATATTACCGCACCAGGCGGCAACATCTGGTCAACGCAAAACA
ACAATGGCTACACAAATATGTCTGGTACGTCAATGGCCTCACCATTTATTGCCGGTTCACAAGC
ATTGTTGAAACAAGCATTGAATAACAAAAACAACCCATTTTATGCTTACTACAAACAACCTTAAAG
GGACAGCGCTCACCGATTTTCTTAAGACAGTTGAGATGAATACTGCCAGCCAATCAACGATAT
TAATAACAATAATGTTATCGTATCGCCGCGGCGGCAAGGGGCGGCTTGTGTTGATGTGAAGGC
AGCCATTGATGCATTAGAAAAGAATCCGTCAACGGTTGTGCGCCGAAAACGGCTACCCGGCAGT

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikat des *prtP*-Gens zur Mutationskontrolle im *L. cremoris* LTH 7122 der Klone 8.11 und 27.11 mit S620S-MAMAR oder S620S-MAMAF11.

TGAATTGAAAGACTTCACGAGTACGGACAAGACCTTTAAACTGACCTTCACGAATCGCACGACC
CATGAACTAACCTATCAAATGGACAGTAATACGGATACTAATGCCGTTTATACATCAGCCGACT
GACAA

27.11 mit S620S-MAMAF11:

NNAGGTTAGTTCATGGGTCGTGCGATTCTGTAAGGTCAGTTTAAAGGTCTTGCCGTA CTCTCGT
GAAGTCTTTCAATTCAACTGCCGGGTAGCCGTTTTTCGGCGACAACCGTTGACGGATTCTTTCT
AATGCATCAATGGCTGCCTTCACATCAACAAGACCGGCCCTTGCCGCCGCGGCGATACGATA
ACATTATTGTAGTTAATATCGTTGATTGGCTGGGCAGTATTCATCTCAACTGTCTTAAGAAAATC
GGTGAGCGCTGTCCCTTTAAGTTGTTTGTAGTAAGCATAAAATGGGTTGTTTTGTTATTCAATG
CTTGTTTCAACAATGCTTGTGAACCGGCAATAAATGGTGAGGCCATTGACGTACCAGACATATT
TGTGTAGCCATTGTTGTTTTGCGTTGACCAGATGTTGCCGCCTGGTGCGGTAATATCTGGTTTG
AAGGAAAGATTGGAACTGGCCCATAGGATGTGAAGTCAGACATCTTGTCTTCAGTATATTTCT
GATTTGGTACCAGCGTCAGGGCAATCTTGACACCGAGACTATCATCCGGGTGTGCTGCGACCC
AGTCAACCAGCTTTTGACCGGTTACACTGGAGAGCCCAAATGTTGGGAAGGTGGTGGTTAACG
CCATAGAAGTCACCGGTGTTGCTGTGCCATCGTTGTTGACAATGATCAAGCCAGCAGCACCAG
CGGCTTGGGCGTATTTTTGTTTGTGAGCAAAAGGTAAGTTCGCCACGTTTAACGATGGCAATTTT
GCCTTTAGCGTCAGCAGTATAGTCGGCTACTTTCCCTTTGCTGAGGTTGCCACTAGCATCTTTA
ACAACATAAACTTCTTTTGGTCAAAGCTACCAGTGAAATCGTTGCTTGAAAGTGAAATGGTTTC
CA

Tabelle 100: Sequenzen der PCR potenzieller *L. cremoris* NZ9000*gal Klone, die mit dem Verfahren nach Guo et al. und Berlec et al. hergestellt wurden.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9gal transformiert worden sind mit gal-tR.

Guo 1:

TGCTCAAAGGAGCAGGATATGAAATTGACAAAGGTTTTGAACTGTTGATTAAAGGAGAAATTCC
TACAGCATCAGGCCTTTCGTCATCAGCTTCACTTGAGCTTTTAGTGCGTGTGTTTTGGATGAT
TTATTTAAGCTAAGTGTTCTCGTCTTGAACTGGTTCAA **CCAAA**ACAAAAACAGAAAATGATTA
TATTGGTGTCAACTCCGGAATTTTGACCAATTCGCCATTGGTTTTGGTGAAGTCAAAAAGGCA
ATCTTGTTGGATTGCAACACTTTAAAATATGAAATGGTTCCTGTTGAACTTCGTGATTATGATAT
TGTTATCATGAACACTAACAAACCGCGGGCATTGACTGAATCAAAATACAACGAACGTTTTGCT
GAAACACGTGAAGCACTCAAAAGAATGCAAACTAAATTGGACATTCAATCACTTGGAGA ACTAT
CAAATGAAGAATTTGATGCCAATACCGATTTGATAGGTGATGAAACATTAATTAACGTGCACG
TCATGCCGTTTATGAAAATAATCGGACGAAAATTGCCAAAAGGCATTTGTTGCTGGAAATCTA
ACAAAATTTGGAGAACTTCTTAATGCTTCACACGCTTCTTTAAAAGATGATTACGAA

Guo 2:

TCAAAGGAATGATTGTCATGCTCAAAGGAGCAGGATATGAAATTGACAAAGGTTTTGAACTGTT
GATTAAAGGAGAAATTCCTACAGCATCAGGCCTTTCGTCATCAGCTTCACTTGAGCTTTTAGTG

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9gal transformiert worden sind mit gal-tR.

GGTGTGTTTTGGATGATTATTTAAGCTAAGTGTTCTCGTCTTGAAGTGGTTCAA **CCAAA**ACA
AAAAACAGAAAATGATTATATTGGTGTCAACTCCGGAATTTTGGACCAATTGCCATTGGTTTTG
GTGAAGTCAAAAAGGCAATCTTGTTGGATTGCAACACTTTAAAATATGAAATGGTTCCTGTTGAA
CTTCGTGATTATGATATTGTTATCATGAACACTAACAAACCGCGGGCATTGACTGAATCAAAATA
CAACGAACGTTTTGCTGAAACACGTGAAGCACTCAAAAGAATGCAAACTAAATTGGACATTCAA
TCACTTGGAGAACTATCAAATGAAGAATTTGATGCCAATACCGATTTGATAGGTGATGAAACATT
AATTAAACGTGCACGTGATGCCGTTTATGAAAATAATCGGACGAAAATTGCCCAAAGGCATTT
GTTGCTGGAAATCTAACAAAATTTGGAGAACTTCTTAATGCTTCACACGCTTCTTTAAAAGATGA
TTACGAAAG

Guo 3:

CATGCTCAAAGGAGCAGGATATGAAATTGACAAAGGTTTTGAAGTGTGATTAAAGGAGAAATT
CCTACAGCATCAGGCCTTTTCGTCATCAGCTTCACTTGAGCTTTTAGTGGGTGTTGTTTTGGATG
ATTTATTTAAGCTAAGTGTTCTCGTCTTGAAGTGGTTCAA **CCAAA**ACAAAAACAGAAAATGAT
TATATTGGTGTCAACTCCGGAATTTTGGACCAATTGCCATTGGTTTTGGTGAAGTCAAAAAGG
CAATCTTGTTGGATTGCAACACTTTAAAATATGAAATGGTTCCTGTTGAAGTTCGTGATTATGAT
ATTGTTATCATGAACACTAACAAACCGCGGGCATTGACTGAATCAAAATACAACGAACGTTTTG
CTGAAACACGTGAAGCACTCAAAAGAATGCAAACTAAATTGGACATTCAATCACTTGGAGAACT
ATCAAATGAAGAATTTGATGCCAATACCGATTTGATAGGTGATGAAACATTAATTAAACGTGCAC
GTCATGCCGTTTATGAAAATAATCGGACGAAAATTGCCCAAAGGCATTTGTTGCTGGAAATCT
AACAAAATTTGGAGAACTTCTTAATGCTTCACACGCTTCTTTAAAAGATGATTACGAAGT

Berlec 20:

GAATGATTGTCATGCTCAAAGGAGCAGGATATGAAATTGACAAAGGTTTTGAAGTGTGATTAA
AGGAGAAATTCCTACAGCATCAGGCCTTTTCGTCATCAGCTTCACTTGAGCTTTTAGTGGGTGTT
GTTTTGGATGATTATTTAAGCTAAGTGTTCTCGTCTTGAAGTGGTTCAA **CCAAA**ACAAAAAC
AGAAAATGATTATATTGGTGTCAACTCCGGAATTTTGGACCAATTGCCATTGGTTTTGGTGA
GTCAAAAAGGCAATCTTGTTGGATTGCAACACTTTAAAATATGAAATGGTTCCTGTTGAAGTTCG
TGATTATGATATTGTTATCATGAACACTAACAAACCGCGGGCATTGACTGAATCAAAATACAAC
GAACGTTTTGCTGAAACACGTGAAGCACTCAAAAGAATGCAAACTAAATTGGACATTCAATCAC
TTGGAGAACTATCAAATGAAGAATTTGATGCCAATACCGATTTGATAGGTGATGAAACATTAATT
AAACGTGCACGTGATGCCGTTTATGAAAATAATCGGACGAAAATTGCCCAAAGGCATTTGTTG
CTGGAAATCTAACAAAATTTGGAGAACTTCTTAATGCTTCACACGCTTCTTTAAAAGATGATTAC
GAAGTA

Tabelle 101: Sequenzen der PCR potenzieller *L. cremoris* NZ9000*oppDBind1 Klone, die mit dem Verfahren nach Guo et al. und Berlec et al. hergestellt wurden.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9oppDBind1 transformiert worden sind mit oppD_Rev.
Berlec long oppDBind1: AAGTTGACTTCCCATAACCTGATTCCCCAACAATAGCTAAACTTCACCACGTTTAAGACTTAAATCAATATCATAAATTGCTTTTTGAAATTTACCAGCAATCCGAAAAGCAACACTCACTTGTTTTGCTTTCCAAAATATTTTCACTTTCCATATTTACCTCAATAAAATCTTTCTAAATAGACTTAATAAAAAGTATACTACTTTTTCTGCATATTTGCAAAAATTTACTATTTTAGGTATGTTTCATGAATTTTCTGAACATTACGCGAAATAAAGGTAAAGCAAAAAGTTTTGGAGGAAATAATAAAAGCAGTAATCATACTAAAACTGCTTTTTATTATTGTTTTATTTTCATGCTGCTCTGTTTTGGACTTTTTATTCTTTATTGATATCATGTCCAAATTTTATTATCTTCTTTTGAAAAATTGGCTTGTAATTTTTCTATTTGCTTAAAAAAGTTATCATTTGAAGGAGGTGGAGTAGGTGTTGGTGTCACAATTCCCATAATATTATACTTACACTTTTTAAAGTGTCTTTCTTTAAAAAATTATGATTTAAACCCGAATTGCTAGTTGATTATTCAGCCATGGCTTGATATCCGGCAGAGTATCTTAAAGTCTTTGAATTCACGGTTTTAGCTGATTTCAACATTAGAGAATAAGTTAAAGCGTCATCTCTAATTTGACTTGAAAACCATAAGAAGAACGACTTTTACAGCGTTCAGCTCCGAGGTTTGTGAGAAAAGAGAATACGCGTTCAATGACTTTTCGACGTTTTGAAAATTTAGGAAAAGTTATGTCCTTTTTCTATTGGCTCTTTAGACCATTTTAAGCGTAATCATCCTTCAAGGCAAA
Berlec 20 oppDBind1: ATGGAGCCTGGAATTTGAGTTTGATTGGATTATGTAATCCCATAACAGCAGTTGCAAAAAGTTGACTTCCCAGAACCTGATTCCCCAACAATAGCTAAACTTCACCACGTTTAAGACTTAAATCAATATCATAAATTGCTTTTTGAAATTTACCAGCAATCCGAAAAGCAACACTCACTTGTTTTGCTTCCAAATATTTTCACTTTCCATATTTACCTCAATAAAATCTTTCTAAATAGACTTAATAAAAAGTATACTACTTTTTCTGCATATTTGCAAAAATTTACTATTTTAGGTATGTTTCATGAATTTTCTGAACATTACGCGAAATAAAGGTAAAGCAAAAAGTTTTGGAGGAAATAATAAAAGCAGTAATCATACTAAAACTGCTTTATTATTGTTTTATTTTCATGCTGCTCTGTTTTGGACTTTTTATTCTTTATTGATATCAGTCCAAATTTTATTATCTTCTTTTGAAAAATTGGCTTGTAATTTTTCTATTTGCTTAAAAAAGTTATCATTTGAAGGAGGTGGAGTAGGTGTTGGTGTCACAATTCCCATAATATTATACTTACACTTTTTAAAAGTGTCTTTCTTTAAAAAATTATGATTTAAACCCGAATTGCTAGTTGATTATTCAGCCATGGCTTGATATCCGGCAGAGTATCTTAAAGTCTTTGAATTCACGGTTTTAGCTGATTTCAACATTAGAGAATAAGTTAAAAGCGTCATCTCTAATTTGACTTGAAAACCATAAGAAGAACGACTTTTACAGCGTTCAGCTCCGAGGTTTGTGAGAAAAGAGAATACGCGTTCAATGACTTTTCGACGTTTTGAAAATTTAGGAAAAGTTATGTCCTTTTTCTATTGGCTCTTTAGACCATTTTAAGCGTAATCATTCTTCAAGGAA
Guo oppDBind1: GCAAAAGTTGACTTCCCAGAACCTGATTCCCCAACAATAGCTAAACTTCACCACGTTTAAGACTTAAATCAATATCATAAATTGCTTTTTGAAATTTACCAGCAATCCGAAAAGCAACACTCACTTGTTTTGCTTCCAAAATATTTTCACTTTCCATATTTACCTCAATAAAATCTTTCTAAATAGACTTAATAAAAGTATACTACTTTTTCTGCATATTTGCAAAAATTTACTATTTTAGGTATGTTTCATGAATTTTCTGAACATTACGCGAAATAAAGGTAAAGCAAAAAGTTTTGGAGGAAATAATAAAAGCAGTAATCATACTAAAACTGCTTTTTATTATTGTTTTATTTTCATGCTGCTCTGTTTTGGACTTTTTATTCTTTATTGATATCAGTCCAAATTTTATTATCTTCTTTTGAAAAATTGGCTTGTAATTTTTCTATTTGCTTAAAAAAGTTATCATTTGAAGGAGGTGGAGTAGGTGTTGGTGTCACAATTCCCATAATATTATACTTACACTTTTTAAAAGTGTCTTTCTTTAAAAAATTATGATTTAAACCCGAATTGCTAGTTGATTATTCAGCCATGGCTTGATATCCGGCAGAGTATCTTAAAGTCTTTGAATTCACGGTTTTAGCTGATTTCAACATTAGAGAATAAGTTAAAAGCGTCATCTCTAATTTGACTTGAAAACCATAAGAAGAACGACTTTTACAGCGTTCAGCTCCGAGGTTTGTGAGAAAAGAGAATACGCGTTCAATGACTTTTCGACGTTTTGAAAATTTAGGAAAAGTTATGTCCTTTTTCTATTGGCTCTTTAGACCATTTTAAGCGTAATCATTCTTCAAGGAA

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9oppDBind1 transformiert worden sind mit oppD_Rev.

TATCAGTCCAAATTTTATTATCTTCTTTTGAAAAATTGGCTTGTAATTTTTCTATTTGCTTAAAAAA
GTTATCATTGAAGGAGGTGGAGTAGGTGTTGGTGTACAAATTCCCATAATATTATACTTACACT
TTTTAAAAGTGTCTTTCTTTAAAAAATTATGATTTAAACCCGAATTGCTAGTTGATTATTCAGCC
ATGGCTTGATATCCGGCAGAGTATCTTAAAGTCTTTGAATTCACGGTTTTAGCTGATTTCAACAT
TAGAGAATAAGTTAAAAGCGTCATCTCTAATTTGACTTGAAAACCATAAGAAGAACGACTTTTAC
AGCGTTCAGCTCCGAGGTTTGTGAGAAAAGAGAATACGCGTTCAATGACTTTTCGACGTTTTGA
AAATTTAGGAAAAGTTATGTCCTTTTTCTATTGGCTCTTTA

Tabelle 102: Sequenzen der PCR potenzieller *L. cremoris* NZ9000*oppDBind1 Klone.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9oppDBind1 transformiert worden sind mit oppDBind_Fw.

Guo 1:

AAGTCATTGAACGCGTATTCTCTTTTCTGACAAACCTCGGAGCTGAACGCTGTAAAAGTCGATC
TTCTTATGGTTTTCAAGTCAAATTAGAGATGACGCTTTTAACTTATTCTCTAATGTTGAAATCAGC
TAAAACCGNGAATTCAAAGACTTTAAGATACTCTGCCGGATATCAAGCCATGGCTGAATAATCA
ACTAGCAATTCGGGTTTTAAATCATAATTTTTTAAAGAAAGGACACTTTTAAAAAGTGTAAGTATAA
TATTATGGGAATTGTGACACCAACACCTACTCCACCTCCTTCAAATGATAACTTTTTTAAAGCAA
TAGAAAAATTACAAGCCAATTTTTCAAAGAAGATAATAAAATTTGGACTGATATCAATAAAGAAT
AAAAAGTCCAAAACAGAGCAGCATGAAAAATAAAACAATAATAAAGCAGTTTTTAGTATGATTA
CTGCTTTTATTATTTCTCCAAAACCTTTTGCTTTACCTTTATTTGCGTAATGTTGAGAAAATTCA
TGAACATACCTAAAATAGTAAATTTTTGCAAATATGCAGAAAAAGTAGTATACTTTTATTAAGTCT
ATTTAGAAAGATTTTATTGAGGTAAATATGGAAAGTGAAAATATTTTGGAAGCAAACAAGTGAG
TGTTGCTTTTCGGATTGCTGGTAAATTTCAAAGCAATTTATGATATTGATTTAAGTCTTAAACG
TGGTGAAGTTTTAGCTATTGTTGGGAATCAGGTTCTGGGAAGTCAACTTTTGCAACTGCTGTT
ATGGGATTACATAATCCAAATCAAACCTCAAATTACAGGCTCCATTTTATTGGATGATGAAGAAGT
GATTGGTAAAACGGGTGATTCCATGGCAAGTATTCGAGGAAGTAAAGTTGGAATGATTTTTCAA
AATCACCCC

Guo2:

AGTCATTGAACGCGTATTCTCTTTTCTGACAAACCTCGGAGCTGAACGCTGTAAAAGTCGATCT
TCTTATGGTTTTCAAGTCAAATTAGAGATGACGCTTTTAACTTATTCTCTAATGTTGAAATCAGCT
AAAACCGAGAATTCAAAGACTTTAAGATACTCTGCCGGATATCAAGCCATGGCTGAATAATCAA
CTAGCAATTCGGGTTTTAAATCATAATTTTTTAAAGAAAGGACACTTTTAAAAAGTGTAAGTATAA
ATTATGGGAATTGTGACACCAACACCTACTCCACCTCCTTCAAATGATAACTTTTTTAAAGCAAAT
AGAAAAATTACAAGCCAATTTTTCAAAGAAGATAATAAAATTTGGACTGATATCAATAAAGAAT
AAAAAGTCCAAAACAGAGCAGCATGAAAAATAAAACAATAATAAAGCAGTTTTTAGTATGATTA
CTGCTTTTATTATTTCTCCAAAACCTTTTGCTTTACCTTTATTTGCGTAATGTTGAGAAAATTCA
TGAACATACCTAAAATAGTAAATTTTTGCAAATATGCAGAAAAAGTAGTATACTTTTATTAAGTCT
ATTTAGAAAGATTTTATTGAGGTAAATATGGAAAGTGAAAATATTTTGGAAGCAAACAAGTGAG

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9oppDBind1 transformiert worden sind mit oppDBind_Fw.

TGTTGCTTTTCGGATTGCTGGTAAATTTCAAAAAGCAATTTATGATATTGATTTAAGTCTTAAACG
 TGGTGAAGTTTTAGCTATTGTTGGGAATCAGGTTCTGGGAAGTCAACTTTTGCAACTGCTGTT
 ATGGGATTACATAATCCAAATCAAACCTCAAATTACAGGCTCCATTTTATTGGATGATGAAGAAGT
 GATTGGTAAAACGGGTGATTCCATGGCAAGTATTCGAGGAAGTAAAGTTGGAATGATTTTTCAA
 ATCANCCCC

Guo3:

GGACATAACTTTTCTAATTTTCAAACGTCGAAAAGTCATTGAACGCGTATTCTCTTTTCTGAC
 AAACCTCGGAGCTGAACGCTGTAAAAGTCGTTCTTCTTATGGTTTTCAAGTCAAATTAGAGATG
 ACGCTTTTAACTTATTCTCTAATGTTGAAATCAGCTAAAACCGTGAATTCAAAGACTTTAAGATA
 CTCTGCCGGATATCAAGCCATGGCTGAATAATCAACTAGCAATTCGGGTTTAAATCATAATTTTT
 TAAAGAAAGGACACTTTTAAAAAGTGTAAGTATAATATTATGGGAATTGTGACACCAACACCTAC
 TCCACCTCCTTCAAATGATAACTTTTTTAAAGCAAATAGAAAAATTACAAGCCAATTTTTCAAAGA
 AGATAATAAAATTTGGACTGATATCAATAAAGAATAAAAAAGTCCAAAACAGAGCAGCATGAAAAA
 TAAACAATAATAAAAGCAGTTTTTAGTATGATTACTGCTTTTATTATTTCTCCAAAACCTTTTGC
 TTTACCTTTATTTTCGCGTAATGTTTCAGAAAATTCATGAACATACCTAAAATAGTAAATTTTTGCAA
 ATATGCAGAAAAAGTAGTATACTTTTATTAAGTCTATTTAGAAAGATTTTATTGAGGTAAATATGG
 AAAGTGAAAATATTTTGAAGCAAAACAAGTGAGTGTTGCTTTTCGGATTGCTGGTAAATTTCAA
 AAAGCAATTTATGATATTGATTTAAGTCTTAAACGTGGTGAAGTTTTAGCTATTGTTGGGGAATC
 AGGTTCTGGGAAGTCAACTTTTGCAACTGCTGTTATGGGATTACATAATCCAAATCAAACCTCAA
 ATTACAGGCTCCATTTTATTGGATGATGAAGAAGTGATTGGTAAAACGGGTGATTCCATGGCAA
 GTATTCGAGGAAGTAAAGTTGGAATGATTTTTCAAATCCANCACCT

Guo4:

AAACGTCGAAAAGTCATTGAACGCGTATTCTCTTTTCTGACAAACCTCGGAGCTGAACGCTGTA
 AAAGTCGTTCTTCTTATGGTTTTCAAGTCAAATTAGAGATGACGCTTTTAACTTATTCTCTAATGT
 TGAAATCAGCTAAAACCGTGAATTCAAAGACTTTAAGATACTCTGCCGGATATCAAGCCATGGC
 TGAATAATCAACTAGCAATTCGGGTTTAAATCATAATTTTTTAAAGAAAGGACACTTTTAAAAAGT
 GTAAGTATAATATTATGGGAATTGTGACACCAACACCTACTCCACCTCCTTCAAATGATAACTTT
 TTTAAGCAAATAGAAAAATTACAAGCCAATTTTTCAAAGAAGATAATAAAATTTGGACTGATATC
 AATAAAGAATAAAAAAGTCCAAAACAGAGCAGCATGAAAAATAAAACAATAATAAAGCAGTTTTT
 AGTATGATTACTGCTTTTATTATTTCTCCAAAACCTTTTGCCTTACCTTTATTTTCGCGTAATGTTT
 AGAAAATTCATGAACATACCTAAAATAGTAAATTTTTGCAAATATGCAGAAAAAGTAGTATACTTT
 TATTAAGTCTATTTAGAAAGATTTTATTGAGGTAAATATGAAAGTGAAAATATTTTGAAGCAA
 AACAAAGTGAGTGTTGCTTTTCGGATTGCTGGTAAATTTCAAAAAGCAATTTATGATATTGATTTA
 AGTCTTAAACGTGGTGAAGTTTTAGCTATTGTTGGGGAATCAGGTTCTGGGAAGTCAACTTTTG
 CAACTGCTGTTATGGGATTACATAATCCAAATCAAACCTCAAATTACAGGCTCCATTTTATTGGAT
 GATGAAGAAGTGATTGGTAAAACGGGTGATTCCATGGCAAGTATTCGAGGAAGTAAAGTTGGA
 ATGATTTTTCAAATCACCCCC

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9oppDBind1 transformiert worden sind mit oppDBind_Fw.

Guo5:

CATTGAACGCGTATTCTCTTTTCTGACAAACCTCGGAGCTGAACGCTGTAAAAGTCGATCTTCT
TATGGTTTTCAAGTCAAATTAGAGATGACGCTTTTAACTTATTCTCTAATGTTGAAATCAGCTAAA
ACCGTGAATTCAAAGACTTTAAGATACTCTGCCGGATATCAAGCCATGGCTGAATAATCAACTA
GCAATTCGGGTTTTAAATCATAATTTTTTAAAGAAAGGACACTTTTAAAAAGTGTAAGTATAATATT
ATGGGAATTGTGACACCAACACCTACTCCACCTCCTTCAAATGATAACTTTTTTAAGCAAATAGA
AAAATTACAAGCCAATTTTTCAAAGAAGATAATAAAATTTGGACTGATATCAATAAAGAATAAAAA
AGTCCAAAACAGAGCAGCATGAAAAATAAAACAATAATAAAAGCAGTTTTTAGTATGATTACTGC
TTTTATTATTTCTCCAAAACCTTTTGCTTTACCTTTATTTTCGCGTAATGTTTCAGAAAATTCATGAA
CATACCTAAAATAGTAAATTTTTGCAAATATGCAGAAAAAGTAGTATACTTTTATTAAGTCTATTT
AGAAAGATTTTATTGAGGTAAATATGGAAAGTGAAAATATTTTGAAGCAAACAAGTGAGTGTT
GCTTTTCGGATTGCTGGTAAATTTCAAAAAGCAATTTATGATATTGATTTAAGTCTTAAACGTGG
TGAAGTTTTAGCTATTGTTGGGAATCAGGTTCTGGGAAGTCAACTTTTGCAACTGCTGTTATG
GGATTACATAATCCAAATCAAACCTCAAATTACAGGCTCCATTTTATTGGATGATGAAGAAGTGAT
TGGTAAAACGGGTGATTCCATGGCAAGTATTTCGAGGAAGTAAAGTTGGAATGATTTTTCAAATC
CACCCC

Guo6:

AAAAGTCATTGAACGCGTATTCTCTTTTCTGACAAACCTCGGAGCTGAACGCTGTAAAAGTCGA
TCTTCTTATGGTTTTCAAGTCAAATTAGAGATGACGCTTTTAACTTATTCTCTAATGTTGAAATCA
GCTAAAACCGTGAATTCAAAGACTTTAAGATACTCTGCCGGATATCAAGCCATGGCTGAATAAT
CAACTAGCAATTCGGGTTTTAAATCATAATTTTTTAAAGAAAGGACACTTTTAAAAAGTGTAAGTA
TAATATTATGGGAATTGTGACACCAACACCTACTCCACCTCCTTCAAATGATAACTTTTTTAAGC
AAATAGAAAAATTACAAGCCAATTTTTCAAAGAAGATAATAAAATTTGGACTGATATCAATAAA
GAATAAAAAGTCCAAAACAGAGCAGCATGAAAAATAAAACAATAATAAAAGCAGTTTTTAGTATG
ATTACTGCTTTTATTATTTCTCCAAAACCTTTTGCTTTACCTTTATTTTCGCGTAATGTTTCAGAAA
TTCATGAACATACCTAAAATAGTAAATTTTTGCAAATATGCAGAAAAAGTAGTATACTTTTATTAA
GTCTATTTAGAAAGATTTTATTGAGGTAAATATGGAAAGTGAAAATATTTTGAAGCAAACAAG
TGAGTGTTGCTTTTCGGATTGCTGGTAAATTTCAAAAAGCAATTTATGATATTGATTTAAGTCTTA
AACGTGGTGAAGTTTTAGCTATTGTTGGGAATCAGGTTCTGGGAAGTCAACTTTTGCAACTGC
TGTTATGGGATTACATAATCCAAATCAAACCTCAAATTACAGGCTCCATTTTATTGGATGATGAAG
AAGTGATTGGTAAAACGGGTGATTCCATGGCAAGTATTTCGAGGAAGTAAAGTTGGAATGATTTT
TCAAATCCATCC

Guo7:

AAGTCATTGAACGCGTATTCTCTTTTCTGACAAACCTCGGAGCTGAACGCTGTAAAAGTCGATC
TTCTTATGGTTTTCAAGTCAAATTAGAGATGACGCTTTTAACTTATTCTCTAATGTTGAAATCAGC
TAAAACCGAGAATTCAAAGACTTTAAGATACTCTGCCGGATATCAAGCCATGGCTGAATAATCA
ACTAGCAATTCGGGTTTTAAATCATAATTTTTTAAAGAAAGGACACTTTTAAAAAGTGTAAGTATAA
TATTATGGGAATTGTGACACCAACACCTACTCCACCTCCTTCAAATGATAACTTTTTTAAGCAA

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9oppDBind1 transformiert worden sind mit oppDBind_Fw.

TAGAAAAATTACAAGCCAATTTTTCAAAAGAAGATAATAAAATTTGGACTGATATCAATAAAGAAT
 AAAAAAGTCCAAAACAGAGCAGCATGAAAAATAAAACAATAATAAAAGCAGTTTTTAGTATGATTA
 CTGCTTTTTATTATTTCTCCAAAACTTTTGCTTTACCTTTATTTTCGCGTAATGTTTCAGAAAATTCA
 TGAACATACCTAAAATAGTAAATTTTTGCAAAATATGCAGAAAAAGTAGTATACTTTTATTAAGTCT
 ATTTAGAAAGATTTTATTGAGGTAAATATGGAAAGTGAAAATATTTTGAAGCAAAACAAGTGAG
 TGTGCTTTTCGGATTGCTGGTAAATTTCAAAAAGCAATTTATGATATTGATTTAAGTCTTAAACG
 TGGTGAAGTTTTAGCTATTGTTGGGGAATCAGGTTCTGGGAAGTCAACTTTTGCAACTGCTGTT
 ATGGGATTACATAATCCAAATCAAACCTCAAATTACAGGCTCCATTTTATTGGATGATGAAGAAGT
 GATTGGTAAAACGGGTGATTCCATGGCAAGTATTCGAGGAAGTAAAGTTGGAATGATTTTTCAA
 AATCCATCCC

Guo8:

CATTGAACGCGTATTCTCTTTTCTGACAAACCTCGGAGCTGAACGCTGTAAAAGTCGATCTTCT
 TATGGTTTTCAAGTCAAATTAGAGATGACGCTTTTAACTTATTCTCTAATGTTGAAATCAGCTAAA
 ACCGNGAATTCAAAGACTTTAAGATACTCTGCCGGATATCAAGCCATGGCTGAATAATCAACTA
 GCAATTCGGGTTTTAAATCATAATTTTTTAAAGAAAGGACACTTTTAAAAAGTGTAAGTATAATATT
 ATGGGAATTGTGACACCAACACCTACTCCACCTCCTTCAAATGATAACTTTTTTAAAGCAAATAGA
 AAAATTACAAGCCAATTTTTCAAAAGAAGATAATAAAATTTGGACTGATATCAATAAAGAATAAAA
 AGTCCAAAACAGAGCAGCATGAAAAATAAAACAATAATAAAAGCAGTTTTTAGTATGATTACTGC
 TTTTATTATTTCTCCAAAACTTTTGCTTTACCTTTATTTTCGCGTAATGTTTCAGAAAATTCATGAA
 CATACTAAAATAGTAAATTTTTGCAAAATATGCAGAAAAAGTAGTATACTTTTATTAAGTCTATTT
 AGAAAGATTTTATTGAGGTAAATATGGAAAGTGAAAATATTTTGAAGCAAAACAAGTGAGTGTT
 GCTTTTCGGATTGCTGGTAAATTTCAAAAAGCAATTTATGATATTGATTTAAGTCTTAAACGTGG
 TGAAGTTTTAGCTATTGTTGGGGAATCAGGTTCTGGGAAGTCAACTTTTGCAACTGCTGTTATG
 GGATTACATAATCCAAATCAAACCTCAAATTACAGGCTCCATTTTATTGGATGATGAAGAAGTGAT
 TGGTAAAACGGGTGATTCCATGGCAAGTATTCGAGGAAGTAAAGTTGGAATGATTTTTCAAAT
 CCATCC

Tabelle 103: Sequenzen der PCR potenzieller *L. cremoris* NZ9000*codY Klone, die mit pTRCas9codY3 transformiert worden sind. Rot markiert sind die Einzelbasen-Mutationen.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9codY3 transformiert worden sind mit CodY_Fw.

Kolonie1 OD 0,83:

TGGACGCTTTTTATGGCAGTATCGTAAATAATAAATAGAAAAAGATGTATGAATAATTCGTATAT
 CTTTTTTTGTTGAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTTATGTTATACTGA
 TTATGAAAAATTTTGTATAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGTGGCTACATTACT
 TGAaaaaacacgtaaaatcacccgcatTTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTGCAACAAGAGTTG
 CCATACAACAGTATGACTGAACGTTAAATCAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTGATTAATA
 CGAAGGGCG

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9codY3 transformiert worden sind mit CodY_Fw.

Kolonie 2 OD 0,83:

CAACGCTTTTTATGGCAGTATCGTAAATAATAAATAGAAAAAGATGTATGAATAATTCGTATATC
TTTTTTTGTGAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTTATGTTATACTGAT
TATGAAAAATTTTGTATAAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGTGGCTACATTACTT
GAAAAAACACGTAAAATCACCGCGATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTGCAACAAGAGTTG
CCATACAACAGTATGACTGAACGTTAAATCAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTGATTAATA
CGAAGGGCGAGTTGCAACACT

Kolonie 3 OD 0,83:

GCAACGCTTTTTATGGCAGTATCGTAAATAATAAATAGAAAAAGATGTATGAATAATTCGTATAT
CTTTTTTGTGAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTTATGTTATACTGA
TTATGAAAAATTTTGTATAAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGTGGCTACATTACT
TGAAAAAACACGTAAAATCACCGCGATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTGCAACAAGAGTTG
CCATACAACAGTATGACTGAACGTTAAATCAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTGATTAATA
CGAAGGGCGAGTTGCAATTGC

Kolonie 4 OD 0,83:

TAATTCGTATATCTTTTTTGTGAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTT
ATGTTATACTGATTATGAAAAATTTTGTATAAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGT
GGCTACATTACTTGAAAAAACACGTAAAATCACCGCGATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTG
CAACAAGAGTTGCCATACAACAGTATGACTGAACGTTAAATCAAACGTCATTGATTGCAACGCCT
GCGTGATTAATACGAAGGGCGAGTTGCATCG

Kolonie 1 OD 1,75:

ACGCTTTTTATGGCAGTATACGTAAATAATAAATAGAAAAAGATGTATGAATAATTCGTATATCTT
TTTTTGTGAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTTATGTTATACTGATTA
TGAAAAATTTTGTATAAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGTGGCTACATTACTTGA
AAAAACACGTAAAATCACCGCGATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTGCAACAAGAGTTGCCA
TACAACAGTATGACTGAACGCTTGGCAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTGATTAATACGA
AGGCCG

Kolonie 2 OD 1,75:

ATGGACGCTTTTTATGGCAGTATCGTAAATAATAAATAGAAAAAGATGTATGAATAATTCGTATA
TCTTTTTTGTGAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTTATGTTATACTG
ATTATGAAAAATTTTGTATAAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGTGGCTACATTAC
TTGAAAAAACACGTAAAATCACCGCGATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTGCAACAAGAGTT
GCCATACAACAGTATGACTGAACGCTTGGCAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTGATTAAT
ACGAAGGCCA

Kolonie 3 OD 1,75:

AATGGAACGCTTTTTATGGCAGTATCGTAAATAATAAATAGAAAAAGATGTATGAATAATTCGTA
TATCTTTTTTGTGAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTTATGTTATAC
TGATTATGAAAAATTTTGTATAAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGTGGCTACATT

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9codY3 transformiert worden sind mit CodY_Fw.

ACTTGAAAAACACGTAAAATCACCGCGATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTGCAACAAGAG
TTGCCATACAACAGTATGACTGAACGCTTGCCAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTGATTA
ATACGAAGGGCGAGTTGCAAGCA

Kolonie 4 OD 1,75:

GCAACGCTTTTTATGGCAGTATCGTAAATAATAAATAGAAAAAGATGTATGAATAATTCGTATAT
CTTTTTTTGTTGAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTTATGTTATACTGA
TTATGAAAAATTTTGTATAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGTGGCTACATTACT
TGAAAAAACACGTAAAATCACCGCGATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTGCAACAAGAGTTG
CCATACAACAGTATGACTGAACGCTTGACAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTGATTAATA
CGAAGGGCGAGTTGCC

Tabelle 104: Sequenzen der PCR potenzieller *L. cremoris* NZ9000*oppDBind Klone, die mit pTRCas9oppDBind2 transformiert worden sind. Rot markiert sind die Einzelbasen-Mutationen.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9oppDBind2 transformiert worden sind mit oppD_Rev.

oppDBind2.1:

TCGATACTTGCCATGGAATCACCCGTTTTACCAATCACTTCTTCATCATCCAATAAAATGGAGCC
TGTAATTTGAGTTTGATTGGATTATGTAATCCCATAACAGCAGTTGCAAAAGTTGACTTCCCAG
AACCTGATTCCCCAACAAATAGCTAAACTTCACCACGTTTAAGACTTAAATCAATATCATAAATT
GCTTTTTGAAATTTACCAGCAATCCGAAAAGCAACACTCACTTGTTTTGCTTCCAAAATATTTTC
ACTTTCCATATTTACCTCAATAAAATCTTTCTAAATAGACTTAATAAAAGTATACTACTTTTTCTGC
ATATTTGCAAAAATTTACTATTTTAGGTATGTTTCATGAATTTTC^{AAAAAA}TACGCGAAATAAAGG
TAAAGCAAAAGTTTTGGAGGAAATAATAAAGCAGTAATCATACTAAAACTGCTTTTATTATTG
TTTTATTTTTCATGCTGCTCTGTTTTGGACTTTTTATTCTTTATTGATATCAGTCCAAATTTATTA
TCTTCTTTTGAAAATTGGCTTGTAATTTTTCTATTTGCTTAAAAAAGTTATCATTGAAGGAGGT
GGAGTAGGTGTTGGTGTCAATTTCCCATAATATTATACTTACACTTTTTAAAAGTGTCTTTCT
TTAAAAAATTATGATTTAAACCCGAATTGCTAGTTGATTATTCAGCCATGGCTTGATATCCGGCA
GAGTATCTTAAAGTCTTTGAATTCACGTTTTAGCTGATTTCAACATTAGAGAATAAGTTAAAAG
CGTCATCTCTAATTTGACTTGAAAACCATAAGAAGAACGACTTTTACAGCGTTTCAGCTCCGAGG
TTTGTGAGAAAAGAGAATACGCGTTCAATGACTTTTCGACGTTTTGAAAATTTAGGAAAAGTTAT
GTCCTTTTTCTATTGGCTCTTTAGACCATTTTAAGCGTATCTTT

oppDBind2.2:

CCCGGTTTTACCAATCACTTCTTCATCATCCAATAAAATGGAGCCTGTAATTTGAGTTTGATTG
GATTATGTAATCCCATAACAGCAGTTGCAAAAGTTGACTTCCCAGAACCTGATTCCCCAACAAAT
AGCTAAACTTCACCACGTTTAAGACTTAAATCAATATCATAAATTGCTTTTTGAAATTTACCAGC
AATCCGAAAAGCAACACTCACTTGTTTTGCTTCCAAAATATTTTCACTTTCCATATTTACCTCAAT
AAAATCTTTCTAAATAGACTTAATAAAAGTATACTACTTTTTCTGCATATTTGCAAAAATTTACTAT
TTTAGGTATGTTTCATGAATTTTC^{AAAAAA}TACGCGAAATAAAGGTAAAGCAAAAGTTTTGGAGG

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9oppDBind2 transformiert worden sind mit oppD_Rev.

AAATAATAAAAGCAGTAATCATACTAAAACTGCTTTTATTATTGTTTTATTTTTCATGCTGCTCT
GTTTTGGACTTTTTATTCTTTATTGATATCAGTCCAAATTTTATTATCTTCTTTGAAAAATTGGCT
TGTAATTTTTCTATTTGCTTAAAAAGTTATCATTTGAAGGAGGTGGAGTAGGTGTTGGTGTCAC
AATTCCCATAATATTATACTTACACTTTTTTAAAAGTGTCTTTCTTTAAAAAATTATGATTTAAACC
CGAATTGCTAGTTGATTATTCAGCCATGGCTTGATATCCGGCAGAGTATCTTAAAGTCTTTGAAT
TCACGGTTTTAGCTGATTTCAACATTAGAGAATAAGTTAAAAGCGTCATCTCTAATTTGACTTGA
AAACCATAAGAAGAACGACTTTTACAGCGTTCAGCTCCGAGGTTTGTGAGAAAAAGAGAATACG
CGTTCAATGACTTTTCGACGTTTTGAAAATTTAGGAAAAGTATGTCCTTTTTCTATTGGCTCTTTA
GACCATTTTAAGCGTATCA

oppDBind2.3: NNNNN

oppDBind2.4:

CCTCGATACTTGCCATGGAATCACCCGTTTTACCAATCACTTCTTCATCATCCAATAAAATGGAG
CCTGTAATTTGAGTTTGATTGGATTATGTAATCCCATAACAGCAGTTGCAAAGTTGACTTCCC
AGAACCTGATTCCCCAACAAATAGCTAAACTTCACCACGTTTAAGACTTAAATCAATATCATAAA
TTGCTTTTTGAAATTTACCAGCAATCCGAAAAGCAACACTCACTTGTTTTGCTTCCAAAATATTTT
CACTTCCATATTTACCTCAATAAAATCTTTCTAAATAGACTTAATAAAAGTATACTACTTTTTCTG
CATATTTGCAAAAATTTACTATTTTAGGTATGTTTCATGAATTTTCAAAATACGCGAAATAAAG
GTAAAGCAAAAGTTTTGGAGGAAATAATAAAAGCAGTAATCATACTAAAACTGCTTTTATTATT
GTTTTATTTTTCATGCTGCTCTGTTTTGGACTTTTTATTCTTTATTGATATCAGTCCAAATTTTATT
ATCTTCTTTTGA AAAATTGGCTTGTAATTTTCTATTTGCTTAAAAAAGTTATCATTTGAAGGAGG
TGGAGTAGGTGTTGGTGTCACAATCCCATAATATTATACTTACACTTTTTTAAAAGTGTCTTTTC
TTTAAAAAATTATGATTTAAACCCGAATTGCTAGTTGATTATTCAGCCATGGCTTGATATCCGGC
AGAGTATCTTAAAGTCTTTGAATTCACGGTTTTAGCTGATTTCAACATTAGAGAATAAGTTAAAA
GCGTCATCTCTAATTTGACTTGAAAACCATAAGAAGAACGACTTTTACAGCGTTCAGCTCCGAG
GTTTGTGAGAAAAGAGAATACGCGTTCAATGACTTTTCGACGTTTTGAAAATTTAGGAAAAGTTA
TGTCTTTTTCTATTGGCTCTTTAGACATTTAGCGACT

oppDBind2.5:

CATATAGGAGGACAAAGATTGTCTGATAAAAAACGTATTAACCAAATTGCTAAAGAACTGGATT
ATCAAATACTGAGCTTGTGCGCAACTGCACAATCACTCGGTTTTGAAGTGAAATCACATTCAAGC
TCTGTAACAGCAGAACAAGCGTAATCATCTTCAAGGCA

oppDBind2.6:

CACTTCTTCATCATCCAATAAAATGGAGCCTGTAATTTGAGTTTGATTGGATTATGTAATCCCA
TAACAGCAGTTGCAAAGTTGACTTCCCAGAACCTGATTCCCCAACAAATAGCTAAACTTCACC
ACGTTTAAGACTTAAATCAATATCATAAATTGCTTTTTGAAATTTACCAGCAATCCGAAAAGCAA
CACTCACTTGTTTTGCTTCCAAAATATTTTCACTTCCATATTTACCTCAATAAAATCTTTCTAAAT
AGACTTAATAAAAGTATACTACTTTTTCTGCATATTTGCAAAAATTTACTATTTTAGGTATGTTCA
TGAATTTTCAAAATACGCGAAATAAAGGTAAAGCAAAAGTTTTGGAGGAAATAATAAAAGCA
GTAATCATACTAAAACTGCTTTTATTATTGTTTTATTTTTCATGCTGCTCTGTTTTGGACTTTTTA

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9oppDBind2 transformiert worden sind mit oppD_Rev.

TTCTTTATTGATATCAGTCCAAATTTTATTATCTTCTTTTGAAAAATTGGCTTGTAATTTTCTATT
TGCTTAAAAAAGTTATCATTTGAAGGAGGTGGAGTAGGTGTTGGTGTGACAATTCCCATAATAT
TACTTACACTTTTTTAAAAGTGTCTTTCTTTAAAAAATTATGATTAAACCCGAATTGCTAGTT
GATTATTCAGCCATGGCTTGATATCCGGCAGAGTATCTTAAAGTCTTTGAATTCACGGTTTAGC
TGATTTCAACATTAGAGAATAAGTTAAAAGCGTCATCTCTAATTTGACTTGAAAACCATAAGAAG
AACGACTTTTACAGCGTTCAGCTCCGAGGTTTGTGAGAAAAGAGAATACGCGTTCAATGACTTT
TCGACGTTTTGAAAATTTAGGAAAAGTTATGTCCTTTTTTCTATTGGCTCTTTAGACCATTTTAAG
CGTAATCAT

oppDBind2.7:

TACCAGATCACTTCTTCATCATCCAATAAAATGGAGCCTGGAATTTGAGTTTGATTGGATTATG
TAATCCCATAACAGCAGTTGCAAAAGTTGACTTCCCAGAACCTGATTCCCCAACAATAGCTAAA
ACTTCACCACGTTTAAAGACTTAAATCAATATCATAAATTGCTTTTTGAAATTTACCAGCAATCCGA
AAAGCAACACTCACTTGTTTTGCTTCCAAAATATTTTCACTTTCCATATTTACCTCAATAAAATCT
TTCTAAATAGACTTAATAAAAGTATACTACTTTTTCTGCATATTTGCAAAAATTTACTATTTTAGGT
ATGTTTCATGAATTTTCAAAAAATACGCGAAATAAAGGTAAAGCAAAAGTTTTGGAGGAAATAAT
AAAAGCAGTAATCATACTAAAACTGCTTTTTATTATTGTTTTATTTTTCATGCTGCTCTGTTTTGG
ACTTTTTATTCTTTATTGATATCAGTCCAAATTTTATTATCTTCTTTTGAAAAATTGGCTTGTAATT
TTTCTATTTTGCTTAAAAAAGTTATCATTTGAAGGAGGTGGAGTAGGTGTTGGTGTGACAATTCCC
ATAATATTATACTTACACTTTTTTAAAAGTGTCTTTCTTTAAAAAATTATGATTAAACCCGAATTG
CTAGTTGATTATTCAGCCATGGCTTGATATCCGGCAGAGTATCTTAAAGTCTTTGAATTCACGG
TTTTAGCTGATTTCAACATTAGAGAATAAGTTAAAAGCGTCATCTCTAATTTGACTTGAAAACCA
TAAGAAGAACGACTTTTACAGCGTTCAGCTCCGAGGTTTGTGAGAAAAGAGAATACGCGTTCAA
TGACTTTTCGACGTTTTGAAAATTTAGGAAAAGTTATGTCCTTTT

oppDBind2.8:

AAAATGGAGCCTGTAATTTGAGTTTGATTGGATTATGTAATCCCATAACAGCAGTTGCAAAAGT
TGACTTCCCAGAACCTGATTCCCCAACAATAGCTAAACTTCACCACGTTTAAAGACTTAAATCAA
TATCATAAATTGCTTTTTGAAATTTACCAGCAATCCGAAAAGCAACACTCACTTGTTTTGCTTCC
AAAATATTTTCACTTTCCATATTTACCTCAATAAAATCTTTCTAAATAGACTTAATAAAAGTATACT
ACTTTTTCTGCATATTTGCAAAAATTTACTATTTAGGTATGTTTCATGAATTTTCAAAAAATACG
CGAAATAAAGGTAAAGCAAAAGTTTTGGAGGAAATAATAAAAGCAGTAATCATACTAAAACTG
CTTTTATTATTGTTTTATTTTTCATGCTGCTCTGTTTTGGACTTTTTATTCTTTATTGATATCAGTC
CAAATTTTATTATCTTCTTTTGAAAAATTGGCTTGTAATTTTCTATTTGCTTAAAAAAGTTATCAT
TTGAAGGAGGTGGAGTAGGTGTTGGTGTGACAATTCCCATAATATTATACTTACACTTTTTTAAAA
GTGTCCTTTCTTTAAAAAATTATGATTAAACCCGAATTGCTAGTTGATTATTCAGCCATGGCTT
GATATCCGGCAGAGTATCTTAAAGTCTTTGAATTCACGGTTTTAGCTGATTTCAACATTAGAGAA
TAAGTTAAAAGCGTCATCTCTAATTTGACTTGAAAACCATAAGAAGAACGACTTTTACAGCGTTC
AGCTCCGAGGTTTGTGAGAAAAGAGAATACGCGTTCAATGACTTTTCGACGTTTTGAAAATTTA
GGAAAAGTTATGTCCTTTTTTCTATTGGCTCTTTAGACCATTTTAAGCG

Tabelle 105: Sequenzen der PCR potenzieller *L. cremoris* NZ9000*codY Klone, die mit pTRCas9codYLR transformiert worden sind. Rot markiert sind die Einzelbasen-Mutationen.

DNA-Sequenz 5'→3': Amplifikate der Klone die mit pTRCas9codYLR transformiert worden sind mit CodY_Fw.
CodYLR1: TTATGGCAGTATCGTAAATAATAAATAGAAAAAGATGTATGAATAATTCGTATATCTTTTTTTGTT GAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTTATGTTATACTGATTATGAAAAAT TTTGTATAAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGTGGCTACATTACTTGAAAAACAC GTAAATCATTAATAATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTGCAACAAGAGTTGCCATACAACAG TATGACTGAACGCTTGGCAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTGATTAATACGAAGGGCGA GTTGCAA
CodYLR2: CGTATATCTTTTTTTGTTGAGAGTAATTTTCTGACAATTTTATTGTTTTTCATGCTTTTTTATGTT ATACTGATTATGAAAAATTTTGTATAAAAAACAAGAATATAAAAAAATAGGAGAACAAAGTGGCTA CATTACTTGAAAAACACGTAAATCATTAATAATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTGCAACAA GAGTTGCCATACAACAGTATGACTGAACGCTTGGCAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTG ATTAATACGAAGGGCGAGTTGCAA
CodYLR3: NNNNN
CodYLR4: AACACGTAAATCATTAATAATTTTGCAAGATGGAGTGACCGATTTGCAACAAGAGTTGCCATAC AACAGTATGACTGAACGCTTGGCAAACGTCATTGATTGCAACGCCTGCGTGATTAATACGAAG GGCGAGTTGCAA

Tabelle 106: Sequenzen zum Nachweis des Stop-Codons auf pNZrecTPG und pNZrecTLR.

DNA-Sequenz 5'→3': Sequenz des <i>recT</i>-Amplifikats des pNZrecTPG zur Überprüfung, ob das Stopp Codon entfernt wurde und des pNZrecTLR mit pNZ8048_Rev.
pNZrecTPG: CTTTATTGGTGGACAATTTACATTAGTCTCGGACATTCTGCTCCCGCCCTTATGGGATTTATCTT CCTTATTCTCGCTTTGATTGTTCTATCGAAAGCGAAATCAAACGAATAATTTATAAATAAAAAAAC CACCTCTAAAAGGTGATTTTTATTTATAAATTACAATTTTTCAGCAATATCAGTAATTGCTTTATC AACTGCTGCTTTTTGGCTATCAATCAAAGCAACACGTGCTGTAATTTGTTTAATTGCCATTTCAA TTGAACGTTTCAAGCCTTGTTTTCTAATTTGGTTCAAAGAAAGCTTGAGCTCTTCAGAAAGGA TAATCGTCTTCTTCAATCGTTGAGACATCAGCTTCACTCTCTTTCTGATTGGTTTCATAACCAGC CATCACATCTAAAGTTTCCTGAACTGGTTCTTCTAAAATTTGGTCCGCCACTTTCGTTAAATCAT CTTTTTCAACTGGTTTGGCTTGTTCAATATCGTTTTCTTGCTCAATAACTTTTTTATTGTTGGTAA ATATTTTTCTTCGAGTACGGCAGCTTGCTCTTCTCGCTCTGGTGTCACATCTTTTCGTTTGAAT TCATTTTCGAGTGTGTCTTTAGCAGCTTGACAAATAAATCATTATCGTTACTAGTATTGATTA TATTTAGCAGCTCGATTGATGACAGTTCTTTTTGCCATTTCTTCTGGGAAATCGTTTTGAACATT TTTTGTTTTTGCTTTACTCCATGACTTATCAATTTGTTTCTTTGTCATGACCGTTGTTACTTCTTTA

DNA-Sequenz 5'→3': Sequenz des *recT*-Amplifikats des pNZrecTPG zur Überprüfung, ob das Stopp Codon entfernt wurde und des pNZrecTLR mit pNZ8048_Rev.

CCATTGCTAGCTTAATAACCACATAAGCAGCCTTGATGTCGTTGTCTAGGTTTTCGAAGGATG
 TTTTCATGTTTAGCCACAATAAGTCGGGCCCCGTCCATAGCAATTTCAAATACATCGCCTTCTCTT
 ACTACAACAGGCGTGATCTCTGCACCTCCTGTTACTCGATCTAATACAGCCATGGTTCCAAAAT
 ATGAGCGCATAAGCTGGACTTTATTTCCATACTTGATAAAATAACATTGTTTTTTTGTGGTGAT
 AATCCTTGGATGACCATATCTAGTAACGCGTTAGAAATAGATGTTTTAGTTTCAGGGTTGTTAGC
 TGCCACTGAAGAAGGTTCCCTCCTGAATTGTTGGTTAGTTCAAGAAAGCACTTTTCATGCATCTG
 CGGGCTATAGCCTGGGGGCATT

pNZrecTLR:

NCTTTATTGGTGGACAATTTACATTAGTCTCGGACATTCTGCTCCCGCCCTTATGGGATTTATCT
 TCCTTATTCTCGCTTTGATTGTTCTATCGAAAGCGAAATCAAACGAATAATTTATAAATAAAAAA
 CCACCTCTAAAAGGTGATTTTTATTTATAAATTACAATTTTTCAGCAATATCAGTAATTGCTTTAT
 CAACTGCTGCTTTTTGGCTATCAATCAAAGCAACACGTGCTGTAATTTGTTTAATTGCCATTTCA
 ATTGAACGTTTCAAGCCTTGGTTTTCTAATTTTGGTTCAAAGAAAGCTTGAGCTCTCTAGATCAG
 AAAGGATAATCGTCTTCTTCAATCGTTGAGACATCAGCTTCACTCTCTTTCTGATTGGTTTCATA
 ACCAGCCATCACATCTAAAGTTTCTGAAGTGGTTCTTCTAAAATTTGGTCCGCCACTTTTCGTTA
 AATCATCTTTTTCAACTGGTTTGGCTTGTCAATATCGTTTTCTTGCTCAATAACTTTTTTATTGTT
 GGTAAATATTTTTTCTTCGAGTACGGCAGCTTGCTCTTCTCGCTCTGGTGTACATCTTTTCGTT
 CGAATTCATTTTCGAGTGTGTCTTTAGCAGCTTGCACAAATAAATCATTATCGTTACTAGTATTG
 ATTAATATTTAGCAGCTCGATTGATGACAGTTCTTTTTGCCATTTCTTCTGGGAAATCGTTTTG
 AACATTTTTTGTGTTTGTCTTACTCCATGACTTATCAATTTGTTTCTTTGTCATGACCGTTGTTAC
 TTCTTTACCATTTGCTAGCTTAATAACCACATAAGCAGCCTTGATGTCGTTGTCTAGGTTTTCGA
 AGGATGTTTCATGTTTAGCCACAATAAGTCGGGCCCCGTCCATAGCAATTTCAAATACATCGCC
 TTCTCTTACTACAACAGGCGTGATCTCTGCACCTCCTGTTACTCGATCTAATACAGCCATGGTT
 CAAAATATGAGCGCATAAGCTGGACTTTATTTCCATACTTGATAAAATAACATTGTTTTTTTGT
 GGTGATAATCCTTGGATGACCATATCTAGTAACGCGTTAGAAATAGATGTTTTAGTTTCAGGGT
 TGTTAGCTGCCAACTGAAGAAGGTTCCCTCCTGAATGGTGGGTAGTTCAAAGAAAGCACTTTTCA
 TGCATTCTGCGGGCTTAGCCTGGGGGCATTTCTAATCCCTGCTCT

VII.2 Full-Plasmid Sequenzierung

Tabelle 107: Full-Plasmid Sequenz von Plasmids pTRCas9PstI.

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9PstI.

GTGATCTGCAGCCAAGCTTTTCGCGAGCTCGAGATCTCGAGCTCGCGAAAGCTTGGCTGCAGT
 AGGTCATGACGCGAAGCAGATGCTGGGCCGTACGCCGGGCAATATTGCTGCCATTCGCCCAA
 TGAAAGACGGCGTTATCGCCGACTTCTTCGTGACTGAAAAATGCTCCAGCACTTCATCAACA
 AGTGACAGCAACAGCTTTATGCGTCCAAGCCCGCGCGTTCTGGTTTGTGTGCCGTTGGCG
 CGACCCAGGTTGAACGCCGCGCAATTCGTGAATCCGCGCAGGGCGCTGGTGCCCGTGAAGTC

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9PstI.

TTCCTGATTGAAGAACCGATGGCTGCCGCAATTGGTGCTGGCCTGCCGTTTCTGAAGCGACC
 GGTCTATGGTGGTTGATATCGGTGGTGGTACCACTGAAGTTGCTGTTATCTCCTTGAACGGT
 GTGGTTTACTCCTCTTCTGTGCGCATTGGTGGTGACCGTTTCGACGAAGCTATCATCAACTATG
 TCGTTCGTAATTACGGTTCTCTGATCGGTGAAGCCACCGCAGAACGTATCAAGCACGAAATCG
 GTTCGGCTTATCCGGGCGATGAAGTCCGTGAAATCGAAGTTCGTGGCCGTAACCTGGCAGAA
 GGTGTTCCACGCGGTTTTACCCTGAACCTCCAATGAAATCCTCGAAGCACTGCAGGTGACGGA
 TCCCCGGGAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCC
 AACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCA
 CCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAATCGATACGATTTTG
 AAGTGGCAACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAAATTGTTGCTGAACTTTTAAAACAAGCAAATACA
 ATCATTGTCGCAACAGATAGCGACAGAGAAGGCGAAAACATTGCCTGGTCGATCATTCAATAA
 GCAAATGCCTTTTCTAAAGATAAAACGTATAAAAGACTATGGATCAATAGTTTAGAAAAAGATGT
 GATCCGTAGCGGTTTTCAAATTTGCAACCAGGAATGAATTACTATCCCTTTTATCAAGAAGCG
 CACAAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAAGATATAATGGGAGATAAGAC
 GGTCGTGTTCTGCTGACTTGCACCATATCATAAAAAATCGAAACAGCAAAGAATGGCGGAAA
 CGTAAAAGAAGTTATGGAAATAAGACTTAGAAGCAAACCTAAGAGTGTGTTGATAGTGCAGTAT
 CTTAAATTTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAAGGAG
 TGATTACATGAACAAAAATATAAAATATTCTCAAACCTTTTTAACGAGTGAAAAAGTACTCAACCA
 AATAATAAAACAATTGAATTTAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGG
 CATTTAACGACGAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTAGACAGTCATCT
 ATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTAAACTGAATACTCGTGCTCACTTTAATTCACCAAGATATTCT
 ACAGTTTCAATTCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTGTTGGGAGTATTCCTTACCATTTAAGCA
 CACAAATTATTAAAAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGCGTCTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAA
 GGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGACACTCAAGTCT
 CGATTACGAATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAAACCAAAAGTAAACAGTGT
 CTTAATAAACTTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACT
 TTGTTTCAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCA
 ATGAAACACGCCAAAGTAAACAATTTAAGTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGTCTATTTTTAA
 TAGTTATCTATTATTTAACGGGAGGAAATAATTCTATGAGTCGCTTTTGTAAATTTGGAAAGTTA
 CACGTTACTAAAGGGAATGTAGATAAATTATTAGGTATACTACTGACAGCTTCCAAGGAGCTAA
 AGAGGTCCCTAGCGCTCTTATCATGGGGAAGCTCGGATCATATGCAAGACAAAATAAACTCGC
 AACAGCACTTGAGAGAAATGGGACGAATCGAGAAAACCCTCTTACGCTGGATTACATATCTAAT
 AAAGCCGTAAGGAGACGGGTTCAAAAAGGTTTAAATAAAGGAGAAGCAATCAATGCATTAGCTA
 GAATTATATTTTTTGGACAACGTGGAGAATTTAGAGAACGTGCTCTCCAAGACCAGTTACAAAG
 AGCTAGTGCATAAACATAATTATTAACGCTATAAGTGTGTGGAACACTGTATATATGGAAAAAG
 CCGTAGAAGAATTAAGCAAGAGGAGAATTTAGAGAAGATTTAATGCCATATGCGTGGCCGTT
 AGGATGGGAACATATCAATTTTCTTGGAGAATACAAATTTGAAGGATTACATGACACTGGGCAA
 ATGAATTTACGTCCTTTACGTATAAAAGAGCCGTTTTATTCTTAATATAACGGCTCTTTTTATAGA
 AAAAATCCTTAGCGTGGTTTTTTTTCCGAAATGCTGGCGGTACCCCAAGAATTAGAAATGAGTAG

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9PstI.

ATCAAATTATTACGAATAGAATCAGGAAAATCAGATCCAACCATAAAAAACACTAGAACAAATTG
 CAAAGTTAACTAACTCAACGCTAGTAGTGGATTAAATCCCAAATGAGCCAACAGAACCAGAACC
 AGAAACAGAATCAGAACAAGTAACATTGGATTAGAAATGGAAGAAGAAAAAAGCAATGACTTC
 GTGTGAATAATGCACGAAATCGTTGCTTATTTTTTTTAAAAGCGGTATACTAGATATAACGAAAC
 AACGAACTGAATAGAAACGAAAAAAGAGCCATGACACATTTATAAAATGTTTGACGACATTTTAT
 AAATGCATAGCCCCGATAAGATTGCCAAACCAACGCTTATCAGTTAGTCAGATGAACTCTTCCCT
 CGTAAGAAGTTATTTAATTAACCTTGTGTTGAAGACGGTATATAACCGTACTATCATTATATAGGG
 AAATCAGAGAGTTTTCAAGTATCTAAGCTACTGAATTTAAGAATTGTTAAGCAATCAATCGGAAA
 TCGTTTGATTGCTTTTTTTGTATTCACTTATAGAAAGGTGGAGTTGTATGAATCATGATGAATGTA
 AACTTATATAAAAAATAGTTTATTGGAGATAAGAAAATTAGCAAATATCTATACACTAGAAACGT
 TTAAGAAAGAGTTAGAAAAGAGAAATATCTACTTAGAAACAAAATCAGATAAGTATTTTTCTTCG
 GAGGGGGAAGATTATATATATAAGTTAATAGAAAATAACAAAATAATTTATTCGATTAGTGGA
 AAAATTGACTTATAAAGGAAAAAAATCTTTTTCAAACATGCAATATTGAAACAGTTGAATGAAAA
 AGCAAACCAAGTTAATTAACAACCTATTTTATAGGATTTATAGGAAAGGAGAACAGCTGAATGA
 ATATCCCTTTTGTGTAGAACTGTGCTTCATGACGGCTTGTTAAAGTACAAATTTAAAAATAGT
 AAAATTCGCTCAATCACTACCAAGCCAGGTAAGCAAAGGGGCTATTTTTGCGTATCGCTCAA
 AATCAAGCATGATTGGCGGTCTGGTGTTGTTCTGACTTCCGAGGAAGCGATTCAAGAAAATC
 AAGATACATTTACACATTGGACACCCAACGTTTATCGTTATGGAACGTATGCAGACGAAAACCG
 TTCATACACGAAAGGACATTCTGAAAACAATTTAAGACAAATCAATACCTTCTTTATTGATTTTGA
 TATTCACACGGCAAAGAACTATTTTCAGCAAGCGATATTTTAACAACCGCTATTGATTTAGGTT
 TTATGCCTACTATGATTATCAAATCTGATAAAGGTTATCAAGCATATTTTGTTTTAGAAACGCCA
 GTCTATGTGACTTCAAATCAGAATTTAAATCTGTCAAAGCAGCCAAAATAATTTGCGAAAATAT
 CCGAGAATATTTTGGAAGTCTTTGCCAGTTGATCTAACGTGTAATCATTTTGGTATTGCTCGCA
 TACCAAGAACGGACAATGTAGAATTTTTTGATCCTAATTACCGTTATTCTTTCAAAGAATGGCAA
 GATTGGTCTTTCAAACAAACAGATAATAAGGGCTTTACTCGTTCAAGTCTAACGGTTTTAAGCG
 GTACAGAAGGCAAAAAACAAGTAGATGAACCCTGGTTTAATCTCTTATTGCACGAAACGAAATT
 TTCAGGAGAAAAGGGTTTAATAGGGCGTAATAACGTCATGTTTACCCTCTCTTTAGCCTACTTTA
 GTTCAGGCTATTCAATCGAAACGTGCGAATATAATATGTTTGAGTTTAATAATCGATTAGATCAA
 CCCTTAGAAGAAAAAGAAGTAATCAAATTTGTTAGAAGTGCCTATTCAGAAAACCTATCAAGGGG
 CTAATAGGGAATACATTACCATTCTTTGCAAAGCTTGGGTATCAAGTGATTTAACCAGTAAAGAT
 TTATTTGTCCGTCAAGGGTGGTTTAAATCAAGAAAAAAGAAGCGAACGTCAACGTGTTCAATT
 TGTCAGAATGGAAAGAAGATTTAATGGCTTATATTAGCGAAAAAAGCGATGTATACAAGCCTTA
 TTTAGTGACGACCAAAAAAGAGATTAGAGAAGTGCTAGGCATTCTGAACGGACATTAGATAAA
 TTGCTGAAGGTACTGAAGGCGAATCAGGAAATTTCTTTAAGATTAAACCAGGAAGAAATGGTG
 GCATTCAACTTGCTAGTGTTAAATCATTGTTGCTATCGATCATTAAAGTAAAAAAGAAGAAAA
 GAAAGCTATATAAAGGCGCTGACAAATCTTTTGACTTAGAGCATACTTCATTCAAGAGACTTT
 AAACAAGCTAGCAGAACGCCCTAAAACGGACACACAACCTCGATTTGTTTAGCTATGATACAGGC
 TGAAAATAAAACCCGCACTATGCCATTACATTTATATCTATGATACGTGTTTGTCTTTTCTTTGCT
 GTTTAGCGAATGATTAGCAGAAATATACAGAGTAAGATTTTAATTAATTATTAGGGGGAGAAGG

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9PstI.

AGAGAGTAGCCCGAAAACCTTTTAGTTGGCTTGGACTGAACGAAGTGAGGGAAAGGCTACTAAA
 ACGTCGAGGGGCAGTGAGAGCGAAGCGAACACTTGATTTTTTAATTTTCTATCTTTTATAGGTC
 ATTAGAGTATACTTATTTGTCCTATAAACTATTTAGCAGCATAATAGATTTATTGAATAGGTCATT
 TAAGTTGAGCATATTAGAGGAGGAAAATCTTGGAGAAATATTTGAAGAACCCGATTACATGGAT
 TGGATTAGTTCTTGTGGTTACGTGGTTTTTAACTAAAAGTAGTGAATTTTTGATTTTTGGTGTGT
 GTGTCTTGTGTTAGTATTTGCTAGTCAAAGTGATTAAATAGAATTCCGGATGAGCATTTCATCAG
 GCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTACGGTCTTTAAA
 AAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCC
 TCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTC
 CATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTA
 TTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTT
 GGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTC
 CGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTG
 TATGATGGTGTTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTTCAGC
 TACTGACGGGGTGGTGCCTAACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTAT
 ACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTGAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAA
 AAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCCTCGCTCACT
 GACTCGCTACGCTCGGTGCTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAG
 ATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAGCCGT
 TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGC
 GAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCT
 CCTGTTCTCGCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCA
 CGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGAAGTGTATGCACGAACCCCC
 CGTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAGTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAAGACA
 TGCAAAAGCACCACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCAT
 GCGCCGGTTAAGGCTAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTAC
 CTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTT
 CGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCA
 GATAAAATATTTCTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGC
 AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAG
 TTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA
 ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCATCGATA
 TCTAGATCTACGAAATCATCCTGTGGAGCTTAGTAGGTTTAGCAAGATGGCAGCGCCTAAATGT
 AGAATGATAAAAGGATTAAGAGATTAATTTCCCTAAAAATGATAAAACAAGCGTTTTTGAAAGCGC
 TTGTTTTTTTTGGTTTGCAGTCAGAGTAGAATAGAAGTATCAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCA
 CTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTTGAATGGTTCCAAC
 AAGATTATTTATAACTTTTATAACAAATAATCAAGGAGAAATTCAAAGAAATTTATCAGCCATAA
 AACAATACTTAATACTATAGAATGATAACAAAATAAACTACTTTTTAAAAGAATTTTGTGTTATAAT
 CTATTTATTATTAAGTATTGGGTAATATTTTTGAAGAGATATTTTGAAAAAGAAAAATTAAAGCA

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9PstI.

TATTAACTAATTTTCGGAGGTCATTAAACTATTATTGAAATCATCAAACTCATTATGGATTTAAT
 TTAACCTTTTTATTTTAGGAGGCCAAAATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCAC
 AAATAGCGTCGGATGGGCGGTGATCACTGATGAATATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGGTT
 CTGGGAAATACAGACCGCCACAGTATCAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGACAGTG
 GAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAAG
 AATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTT
 TCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAAGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTT
 GGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAATCTATCATCTGCGAAAAAA
 ATTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGGATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTA
 AGTTTCGTGGTCATTTTTTGATTGAGGGAGATTTAAATCCTGATAATAGTGATGTGGACAACTA
 TTTATCCAGTTGGTACAAACCTACAATCAATTATTTGAAGAAAACCCTATTAACGCAAGTGGAGT
 AGATGCTAAAGCGATTCTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCT
 CAGCTCCCCGGTGAGAAGAAAAATGGCTTATTTGGGAATCTCATTGCTTTGTCATTGGGTTTGA
 CCCCTAATTTTAAATCAAATTTTGATTGCGAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAAGATACTT
 ACGATGATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAATATGCTGATTTGTTTTTGGCA
 GCTAAGAATTTATCAGATGCTATTTTACTTTTCAGATATCCTAAGAGTAAATACTGAAATAACTAA
 GGCTCCCCATCAGCTTCAATGATTAAACGCTACGATGAACATCATCAAGACTTGACTCTTTTAA
 AAGCTTTAGTTTCGACAACAACCTCCAGAAAAGTATAAAGAAATCTTTTTTGATCAATCAAAAAAC
 GGATATGCAGGTTATATTGATGGGGGAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATAAATTTATCAAACCAA
 TTTTAGAAAAAATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAACTAAATCGTGAAGATTTGCTGCG
 CAAGCAACGGACCTTTGACAACGGCTCTATTCCCATCAAATTCATTGGGTGAGCTGCATGC
 TATTTTGAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTAAAAGACAATCGTGAGAAGATTGAAAAAA
 TCTTGACTTTTCGAATTCCTTATTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGCATG
 GATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGAAGTTGTGATAAAGGT
 GCTTCAGCTCAATCATTTATTGAACGCATGACAACTTTGATAAAAATCTTCCAATGAAAAAGT
 ACTACCAAACATAGTTTGCTTTATGAGTATTTTACGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAAAT
 ATGTTACTGAAGGAATGCGAAAACCAGCATTCTTTTCAGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTGA
 TTTACTCTTCAAACAAATCGAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAGAAGATTATTTCAAAAAAAT
 AGAATGTTTTGATAGTGTTGAAATTTGAGGAGTTGAAGATAGATTTAATGCTTCATTAGGTACCT
 ACCATGATTTGCTAAAAATTATTAAGATAAAGATTTTTTTGGATAATGAAGAAAATGAAGATATCT
 TAGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGAAGATAGGGAGATGATTGAGGAAAGACTTAAA
 ACATATGCTCACCTCTTTGATGATAAGGTGATGAAACAGCTTAAACGTCGCCGTTATACTGGTT
 GGGGACGTTTGTCTCGAAAATTGATTAATGGTATTAGGGATAAGCAATCTGGCAAAACAATATT
 AGATTTTTTTGAAATCAGATGGTTTTGCCAATCGCAATTTTATGCAGCTGATCCATGATGATAGTT
 TGACATTTAAAGAAGACATTCAAAAAGCACAAGTGTCTGGACAAGGCGATAGTTTACATGAACA
 TATTGCAAATTTAGCTGGTAGCCCTGCTATTAAAAAAGGTATTTTACAGACTGTAAAAGTTGTTG
 ATGAATTGGTCAAAGTAATGGGGCGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGGCACGTG
 AAAATCAGACAACCTCAAAAGGGCCAGAAAAATTTCGCGAGAGCGTATGAAACGAATCGAAGAAG
 GTATCAAAGAATTAGGAAGTCAGATTCTTAAGAGCATCCTGTTGAAAATACTCAATTGCAAAAT

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9PstI.

GAAAAGCTCTATCTCTATTATCTCCAAAATGGAAGAGACATGTATGTGGACCAAGAATTAGATAT
 TAATCGTTTAAAGTGATTATGATGTCGATCACATTGTTCCACAAAGTTTCCTTAAAGACGATTCAA
 TAGACAATAAGGTCTTAACGCGTTCTGATAAAAATCGTGGTAAATCGGATAACGTTCCAAGTGA
 AGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAACTATTGGAGACAACTTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAA
 CGTAAGTTTGATAATTTAACGAAAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAAGTTGATAAAGCTGGTT
 TTATCAAACGCCAATTGGTTGAAACTCGCCAAATCACTAAGCATGTGGCACAAATTTTGGATAG
 TCGCATGAATACTAAATACGATGAAAATGATAAACTTATTCGAGAGGTTAAAGTGATTACCTTAA
 AATCTAAATTAGTTTCTGACTTCCGAAAAGATTTCCAATTCTATAAAGTACGTGAGATTAACAATT
 ACCATCATGCCCATGATGCGTATCTAAATGCCGTCGTTGGAAGTCTTTGATTAAAGAAATATCC
 AAACTTGAATCGGAGTTTGTCTATGGTGATTATAAAGTTTATGATGTTTCGTAAAATGATTGCTA
 AGTCTGAGCAAGAAATAGGCAAAGCAACCGCAAAATATTTCTTTTACTCTAATATCATGAACTTC
 TTCAAACAGAAATTACACTTGCAAATGGAGAGATTTCGCAAACGCCCTCTAATCGAAACTAATG
 GGGAACTGGAGAAATTGTCTGGGATAAAGGGCGAGATTTTGCCACAGTGCAGCAAAGTATTGT
 CCATGCCCCAAGTCAATATTGTCAAGAAAACAGAAGTACAGACAGGCGGATTCTCCAAGGAGT
 CAATTTTACCAAAAAGAAATTCGGACAAGCTTATTGCTCGTAAAAAAGACTGGGATCCAAAAAA
 ATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCTTATTCAGTCCTAGTGGTTGCTAAGGTGGAAAAA
 GGGAAATCGAAGAAGTTAAAATCCGTTAAAGAGTTACTAGGGATCACAATTATGGAAAGAAGTT
 CCTTTGAAAAAATCCGATTGACTTTTTAGAAAGCTAAAGGATATAAGGAAGTTAAAAAAGACTTA
 ATCATTAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTAGAAAACGGTCGTAAACGGATGCTGGCTAG
 TGCCGGAGAATTACAAAAAGGAAATGAGCTGGCTCTGCCAAGCAAATATGTGAATTTTTTATAT
 TTAGCTAGTCATTATGAAAAGTTGAAGGGTAGTCCAGAAGATAACGAACAAAAACAATTGTTTG
 TGGAGCAGCATAAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGTGAATTTTCTAAGCGTGTT
 ATTTTAGCAGATGCCAATTTAGATAAAGTTCTTAGTGATATAACAAACATAGAGACAAACCAAT
 ACGTGAACAAGCAGAAAATATTATTCATTTATTTACGTTGACGAATCTTGAGCTCCCGCTGCTT
 TTAATATTTTGATACAACAATTGATTGTAAACGATATACGTCTACAAAAGAAGTTTTAGATGCCA
 CTCTTATCCATCAATCCATCACTGGTCTTTATGAAACACGCATTGATTTGAGTCAGCTAGGAGG
 TGAAGTATATTTTAGATGAAGATTATTTCTTAATAACTAAAAATATGGTATAATACTCTTAA
 TAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTCAAGACTGAAGTCTAGCTGAGACAAATAGTGCGATTACG
 AAATTTTTTAGACAAAAATAGTCTACGAGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAC
 TGAGACCAGTCTCGGAAGCTCAAAGGTCTCGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAA
 ACTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCCATGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGACTCC
 ATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAGAGGGTTAATACCAGCAGTCGGATACCTTCCTAT
 TCTTTCTGTAAAGCGTTTTTCATGTTATAATAGGCAAAAAGAAGAGTAGT

Tabelle 108: Full-Plasmid Sequenz von pTRCas9.25A.

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9.25A.

GTGGCAACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAATTGTTGCTGAACTTTTAAACAAGCAAATACAAT
 CATTGTCGCAACAGATAGCGACAGAGAAGGCGAAAACATTGCCTGGTCGATCATTCATAAAGC
 AAATGCCTTTTCTAAAGATAAAACGTATAAAAGACTATGGATCAATAGTTTGAAGAAAGATGTGA

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9.25A.

TCCGTAGCGGTTTTCAAATTTGCAACCAGGAATGAATTACTATCCCTTTTATCAAGAAGCGCA
 CAAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAAGATATAATGGGAGATAAGACGG
 TTCGTGTTCTGTGCTGACTTGACCATATCATAAAAAATCGAAACAGCAAAGAATGGCGGAAACGT
 AAAAGAAGTTATGGAAATAAGACTTAGAAGCAAACCTTAAGAGTGTGTTGATAGTGCAGTATCTT
 AAAATTTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAAGGAGTG
 ATTACATGAACAAAAATATAAAATATTCTCAAACTTTTTAACGAGTGAAAAAGTACTCAACCAAA
 TAATAAAACAATTGAATTTAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGCA
 TTTAACGACGAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTAGACAGTCATCTAT
 TCAACTTATCGTCAGAAAAATTAAACTGAATACTCGTGTCACTTTAATTCACCAAGATATTCTA
 CAGTTTCAATTCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTGTTGGGAGTATTCCTTACCATTAAAGCAC
 ACAAATTATTAAAAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGCGTCTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAAG
 GATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGCACACTCAAGTCTC
 GATTGAGCAATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAAACCAAAAAGTAAACAGTGTC
 TTAATAAACTTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACTT
 TGTTTTCAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAA
 TGAACACGCCAAAGTAAACAATTTAAGTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGTCTATTTTTAAT
 AGTTATCTATTATTTAACGGGAGGAAATAATTCTATGAGTCGCTTTTGTAATTTGGAAAGTTAC
 ACGTTACTAAAGGGAATGTAGATAAATTATTAGGTATACTACTGACAGCTTCCAAGGAGCTAAA
 GAGGTCCCTAGCGCTCTTATCATGGGGAAGCTCGGATCATATGCAAGACAAAATAAACTCGCA
 ACAGCACTTGAGAAATGGGACGAATCGAGAAAACCTCTTTACGCTGGATTACATATCTAATA
 AAGCCGTAAGGAGACGGGTTCAAAAAGGTTTAAATAAAGGAGAAGCAATCAATGCATTAGCTA
 GAATTATATTTTTTGGACAACGTGGAGAATTTAGAGAACGTGCTCTCCAAGACCAGTTACAAAG
 AGCTAGTGCACTAAACATAATTATTAACGCTATAAGTGTGTGGAACACTGTATATATGGAAAAAG
 CCGTAGAAGAATTAAGCAAGAGGAGAATTTAGAGAAGATTTAATGCCATATGCGTGGCCGTT
 AGGATGGGAACATATCAATTTTCTTGGAGAATACAAATTTGAAGGATTACATGACACTGGGCAA
 ATGAATTTACGTCCTTTACGTATAAAAGAGCCGTTTTATTCTTAATATAACGGCTCTTTTTATAGA
 AAAATCCTTAGCGTGGTTTTTTTTCCGAAATGCTGGCGGTACCCCAAGAATTAGAAATGAGTAG
 ATCAAATTATTCACGAATAGAATCAGGAAAATCAGATCCAACCATAAAAACTAGAACAAATTG
 CAAAGTTAACTAACTCAACGCTAGTAGTGGAATTAATCCCAAATGAGCCAACAGAACCAGAACC
 AGAAACAGAATCAGAACAAGTAACATTGGATTTAGAAATGGAAGAAGAAAAAAGCAATGACTTC
 GTGTGAATAATGCACGAAATCGTTGCTTATTTTTTTTTAAAGCGGTATACTAGATATAACGAAAC
 AACGAACTGAATAGAAACGAAAAAGAGCCATGACACATTTATAAAATGTTTGACGACATTTTAT
 AAATGCATAGCCCGATAAGATTGCCAAACCAACGCTTATCAGTTAGTCAGATGAACTCTTCCT
 CGTAAGAAGTTATTTAATTAACCTTTGTTTGAAGACGGTATATAACCGTACTATCATTATATAGGG
 AAATCAGAGAGTTTTCAAGTATCTAAGCTACTGAATTTAAGAATTGTTAAGCAATCAATCGGAAA
 TCGTTTGATTGCTTTTTTTGTATTCAATTTATAGAAGGTGGAGTTTGTATGAATCATGATGAATGTA
 AAATCTATATAAAAAATAGTTTATTGGAGATAAGAAAATTAGCAAATATCTATACACTAGAAACGT
 TTAAGAAAGAGTTAGAAAAGAGAAATATCTACTTAGAAACAAAATCAGATAAGTATTTTTCTTCG
 GAGGGGGAAGATTATATATATAAGTTAATAGAAAATAACAAAATAATTTATTGATTAGTGGAAG

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9.25A.

AAAATTGACTTATAAAGGAAAAAATCTTTTTCAAACATGCAATATTGAAACAGTTGAATGAAAA
 AGCAAACCAAGTTAATTAACAACCTATTTTATAGGATTTATAGGAAAGGAGAACAGCTGAATGA
 ATATCCCTTTTGTGTAGAACTGTGCTTCATGACGGCTTGTTAAAGTACAAATTTAAAAATAGT
 AAAATTGCTCAATCACTACCAAGCCAGGTAAGCAAAGGGGCTATTTTTGCGTATCGCTCAA
 AATCAAGCATGATTGGCGGTCGTGGTGTGTTCTGACTTCCGAGGAAGCGATTCAAGAAAATC
 AAGATACATTTACACATTGGACACCCAACGTTTATCGTTATGGAACGTATGCAGACGAAAACCG
 TTCATACACGAAAGGACATTCTGAAAACAATTTAAGACAAATCAATACCTTCTTTATTGATTTTGA
 TATTCACACGGCAAAGAACTATTTTCAGCAAGCGATATTTTAACAACCGCTATTGATTTAGGTT
 TTATGCCTACTATGATTATCAAACTCTGATAAAGTTATCAAGCATATTTTGTTTTAGAAACGCCA
 GTCTATGTGACTTCAAATCAGAATTTAAATCTGTCAAAGCAGCCAAAATAATTTGCAAAATAT
 CCGAGAATATTTTGAAAGTCTTTGCCAGTTGATCTAACGTGTAATCATTTTGGTATTGCTCGCA
 TACCAAGAACGGACAATGTAGAATTTTTTGATCCTAATTACCGTTATTCTTTCAAAGAATGGCAA
 GATTGGTCTTTCAAACAAACAGATAATAAGGGCTTTACTCGTTCAAGTCTAACGGTTTTAAGCG
 GTACAGAAGGCAAAAAACAAGTAGATGAACCCTGGTTTAATCTCTTATTGCACGAAACGAAATT
 TTCAGGAGAAAAGGGTTTAATAGGGCGTAATAACGTATGTTTACCCTCTCTTTAGCCTACTTTA
 GTTCAGGCTATTCAATCGAAACGTGCGAATATAATATGTTTGAGTTTAATAATCGATTAGATCAA
 CCTTAGAAGAAAAAGAAGTAATCAAATTGTTAGAAGTGCCTATTCAGAAAACCTATCAAGGGG
 CTAATAGGGAATACATTACCATTCTTTGCAAAGCTTGGGTATCAAGTGATTTAACAGTAAAGAT
 TTATTTGTCCGTCAAGGGTGGTTTAAATTCAAGAAAAAAGAAGCGAACGTCAACGTGTTTCATT
 TGTCAGAATGGAAGAAGATTTAATGGCTTATATTAGCGAAAAAAGCGATGTATACAAGCCTTA
 TTTAGTGACGACCAAAAAAGAGATTAGAGAAGTGCTAGGCATTCCTGAACGGACATTAGATAAA
 TTGCTGAAGGTACTGAAGGCGAATCAGGAAATTTTCTTTAAGATTAAACCAGGAAGAAATGGTG
 GCATTCAACTTGCTAGTGTTAAATCATTGTTGCTATCGATCATTAAAGTAAAAAAGAAGAAAAA
 GAAAGCTATATAAAGGCGCTGACAAATTCTTTTACTTAGAGCATACATTCATTCAAGAGACTTT
 AAACAAGCTAGCAGAACGCCCTAAAACGGACACACAACCTCGATTTGTTTAGCTATGATACAGGC
 TGAAAATAAAACCCGCACTATGCCATTACATTTATATCTATGATACGTGTTTGTTTTCTTTGCT
 GTTTAGCGAATGATTAGCAGAAATATACAGAGTAAGATTTTAATTAATTATTAGGGGGAGAAGG
 AGAGAGTAGCCCGAAAACCTTTTAGTTGGCTTGGACTGAACGAAGTGAGGGAAAGGCTACTAAA
 ACGTCGAGGGGCGAGTGAAGCGAAGCGAACACTTGATTTTTTAATTTCTATCTTTTATAGGTC
 ATTAGAGTATACTTATTTGTCCTATAAACTATTTAGCAGCATAATAGATTTATTGAATAGGTCATT
 TAAGTTGAGCATATTAGAGGAGGAAAATCTTGAGAAAATATTTGAAGAACCCGATTACATGGAT
 TGGATTAGTTCTTGTTGGTTACGTGGTTTTTAACTAAAAGTAGTGAATTTTTGATTTTTGGTGTGT
 GTGTCTTGTTGTTAGTATTTGCTAGTCAAAGTGATTAAATAGAATTCCGGATGAGCATTTCATCAG
 GCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAA
 AAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCC
 TCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTC
 CATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTA
 TTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTT
 GGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTC

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9.25A.

CGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTG
 TATGATGGTGTTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTTCAGC
 TACTGACGGGGTGGTGCGTAACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTAT
 ACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTGAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAA
 AAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCCTCGCTCACT
 GACTCGCTACGCTCGGTGCTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAG
 ATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAGCCGT
 TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGC
 GAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCT
 CCTGTTCTGCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCA
 CGCCTGACACTCAGTTCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCC
 CGTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAAGACA
 TGCAAAGCACCCTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCAT
 GCGCCGGTTAAGGCTAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTAC
 CTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTT
 CGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCA
 GATAAAATATTTCTAGCCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGC
 AGCTGGCACGACAGGTTTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAG
 TTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA
 ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCATCGATA
 TCTAGATCTACGAAATCATCCTGTGGAGCTTAGTAGGTTTAGCAAGATGGCAGCGCCTAAATGT
 AGAATGATAAAAGGATTAAGAGATTAATTTCCCTAAAAATGATAAAACAAGCGTTTTTGAAAGCGC
 TTGTTTTTTTGGTTTGCAGTCAGAGTAGAATAGAAGTATCAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCA
 CTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTTGAATGGTTCCAAC
 AAGATTATTTTATACTTTTATAACAAATAATCAAGGAGAAATTCAAAGAAATTTATCAGCCATAA
 AACAATACTTAATACTATAGAATGATAACAAAATAAACTACTTTTTAAAAGAATTTTGTGTTATAAT
 CTATTTATTATTAAGTATTGGGTAATATTTTTTGAAGAGATATTTTGAAAAAGAAAAATTAAGCA
 TATTAACTAATTTTCGGAGGTCATTAATACTATTATTGAAATCATCAAATCATTATGGATTTAAT
 TTAACCTTTTTATTTTAGGAGGCAAAAATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCAC
 AAATAGCGTCGGATGGGCGGTGATCACTGATGAATATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGGTT
 CTGGGAAATACAGACCGCCACAGTATCAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGACAGTG
 GAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAAG
 AATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTT
 TCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAAGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTT
 GGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAACTATCTATCATCTGCGAAAAAA
 ATTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGGATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTA
 AGTTTCGTGGTCATTTTTTATTGAGGGAGATTAAATCCTGATAATAGTGATGTGGACAACTA
 TTTATCCAGTTGGTACAAACCTACAATCAATTATTTGAAGAAAACCTATTAACGCAAGTGAGT
 AGATGCTAAAGCGATTCTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCT

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9.25A.

CAGCTCCCCGGTGAGAAGAAAAATGGCTTATTTGGGAATCTCATTGCTTTGTCATTGGGTTTGA
 CCCCTAATTTTAAATCAAATTTTGATTGGCAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAAGATACTT
 ACGATGATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAATATGCTGATTTGTTTTTGGCA
 GCTAAGAATTTATCAGATGCTATTTTACTTTTCAGATATCCTAAGAGTAAATACTGAAATAACTAA
 GGCTCCCCTATCAGCTTCAATGATTAAACGCTACGATGAACATCATCAAGACTTGACTCTTTTAA
 AAGCTTTAGTTTCGACAACAACCTTCCAGAAAAGTATAAAGAAATCTTTTTTGGATCAATCAAAAAAC
 GGATATGCAGGTTATATTGATGGGGGAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATAAATTTATCAAACCAA
 TTTTAGAAAAAATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAAACTAAATCGTGAAGATTTGCTGCG
 CAAGCAACGGACCTTTGACAACGGCTCTATTCCCCTCAAAATCACTTGGGTGAGCTGCATGC
 TATTTTGAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTAAAAGACAATCGTGAGAAGATTGAAAAAA
 TCTTGACTTTTTCGAATTCCTTATTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGCATG
 GATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGAAGTTGTCGATAAAGGT
 GCTTCAGCTCAATCATTTATTGAACGCATGACAACTTTGATAAAAATCTTCCAAATGAAAAAGT
 ACTACCAAACATAGTTTGCTTTATGAGTATTTTACGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAAAT
 ATGTTACTGAAGGAATGCGAAAACCAGCATTCTTTTCAGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTGA
 TTTACTCTTCAAACAAATCGAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAGAAGATTATTTCAAAAAAAT
 AGAATGTTTTGATAGTGTTGAAATTCAGGAGTTGAAGATAGATTTAATGCTTCATTAGGTACCT
 ACCATGATTTGCTAAAAATTATTAAAGATAAAGATTTTTTGGATAATGAAGAAAATGAAGATATCT
 TAGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGAAGATAGGGAGATGATTGAGGAAAGACTTAAA
 ACATATGCTCACCTCTTTGATGATAAGGTGATGAAACAGCTTAAACGTCGCCGTTATACTGGTT
 GGGGACGTTTGTCTCGAAAATTGATTAATGGTATTAGGGATAAGCAATCTGGCAAAACAATATT
 AGATTTTTTGAATCAGATGGTTTTGCCAATCGCAATTTTATGCAGCTGATCCATGATGATAGTT
 TGACATTTAAAGAAGACATTCAAAAAGCACAAGTGTCTGGACAAGGCGATAGTTTACATGAACA
 TATTGCAAATTTAGCTGGTAGCCCTGCTATTAAAAAAGGTATTTTACAGACTGTAAAAGTTGTTG
 ATGAATTGGTCAAAGTAATGGGGCGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGGCACGTG
 AAAATCAGACAACCTCAAAAGGGCCAGAAAAATTTCGCGAGAGCGTATGAAACGAATCGAAGAAG
 GTATCAAAGAATTAGGAAGTCAGATTCTTAAGAGCATCCTGTTGAAAATACTCAATTGCAAAAT
 GAAAAGCTCTATCTCTATTATCTCCAAAATGGAAGAGACATGTATGTGGACCAAGAATTAGATAT
 TAATCGTTTTAAGTGATTATGATGTCGATCACATTGTTCCACAAAGTTTCCTTAAAGACGATTCAA
 TAGACAATAAGGTCTTAACGCGTTCTGATAAAAATCGTGGTAAATCGGATAACGTTCCAAGTGA
 AGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAACTATTGGAGACAACCTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAA
 CGTAAGTTTGATAATTTAACGAAAGCTGAACGTGGAGTTTGAGTGAACCTGATAAAGCTGGTT
 TTATCAAACGCCAATTGGTTGAAACTCGCCAAATCACTAAGCATGTGGCACAAATTTTGGATAG
 TCGCATGAATACTAAATACGATGAAAATGATAAACTTATTCGAGAGGTTAAAGTGATTACCTTAA
 AATCTAAATTAGTTTCTGACTTCCGAAAAGATTTCCAATTCTATAAAGTACGTGAGATTACAATT
 ACCATCATGCCCATGATGCGTATCTAAATGCCGTCGTTGGAAGTCTTTGATTAAGAAATATCC
 AAAACTTGAATCGGAGTTTGTCTATGGTGATTATAAAGTTTATGATGTTGTAAGTAAATGATTGCTA
 AGTCTGAGCAAGAAATAGGCAAAGCAACCGCAAAATATTTCTTTTACTCTAATATCATGAACCTC
 TTCAAACAGAAATTACACTTGCAAATGGAGAGATTTCGCAAACGCCCTCTAATCGAAACTAATG

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9.25A.

GGGAACTGGAGAAATTGTCTGGGATAAAGGGCGAGATTTTGCCACAGTGC GCAAAGTATTGT
 CCATGCCCCAAGTCAATATTGTCAAGAAAACAGAAGTACAGACAGGCGGATTCTCCAAGGAGT
 CAATTTTACCAAAAAGAAATTCGGACAAGCTTATTGCTCGTAAAAAAGACTGGGATCCAAAAA
 ATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCTTATTCAGTCCTAGTGGTTGCTAAGGTGGAAAAA
 GGGAAATCGAAGAAGTTAAAATCCGTTAAAGAGTTACTAGGGATCACAATTATGGAAAGAAGTT
 CCTTTGAAAAAATCCGATTGACTTTTTTAGAAGCTAAAGGATATAAGGAAGTTAAAAAAGACTTA
 ATCATTAAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTAGAAAACGGTCGTAAACGGATGCTGGCTAG
 TGCCGGAGAATTACAAAAAGGAAATGAGCTGGCTCTGCCAAGCAAATATGTGAATTTTTTATAT
 TTAGCTAGTCATTATGAAAAGTTGAAGGGTAGTCCAGAAGATAACGAACAAAAACAATTGTTTG
 TGGAGCAGCATAAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGTGAATTTTCTAAGCGTGTT
 ATTTTAGCAGATGCCAATTTAGATAAAGTTCTTAGTG CATATAACAAACATAGAGACAAACCAAT
 ACGTGAACAAGCAGAAAATATTATTCATTTATTTACGTTGACGAATCTTGAGCTCCCGCTGCTT
 TAAATATTTTGATACAACAATTGATCGTAAACGATATACGTCTACAAAAGAAGTTTTAGATGCC
 ACTCTTATCCATCAATCCATCACTGGTCTTTATGAAACACGCATTGATTTGAGTCAGCTAGGAG
 GTGACTGAAGTATATTTTAGATGAAGATTATTTCTTAATAACTAAAAATATGGTATAATACTCTTA
 ATAAATGCAGTAATACAGGGGCTTTTCAAGACTGAAGTCTAGCTGAGACAAATAGTGCGATTAC
 GAAATTTTTTAGACAAAAATAGTCTACGAGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAA
 CACAACAATGGCTACACAAATATGTCGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTC
 AGCACACTGAGACTTGTTGAGTTCCATGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGACTCCATTCA
 ACATTGCCGATGATAACTTGAGAAAGAGGGTTAATACCAGCAGTCGGATACCTTCCTATTCTTT
 CTGTTAAAGCGTTTTTCATGTTATAATAGGCAAAAGAAGAGTAGTGGTGATCTGCAGGTCGACGG
 ATCCCCGGGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACC
 CAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC
 ACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAATCGATACGATTTT
 GAA

Tabelle 109: Full-Plasmid Sequenz von pTRCas9codYLR.

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9codYLR.

GTGGCAACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAATTTGTTGCTGAACTTTTAAACAAGCAAATACAAT
 CATTGTCGCAACAGATAGCGACAGAGAAGGCGAAAACATTGCCTGGTCGATCATTCATAAAGC
 AAATGCCTTTTCTAAAGATAAAACGTATAAAAGACTATGGATCAATAGTTTAGAAAAAGATGTGA
 TCCGTAGCGGTTTTCAAATTTGCAACCAGGAATGAATTACTATCCCTTTTATCAAGAAGCGCA
 CAAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAAAGATATAATGGGAGATAAGACGG
 TTCGTGTTGCTGCTGACTTGACCATATCATAAAAATCGAAACAGCAAAGAATGGCGGAAACGT
 AAAAGAAGTTATGGAAATAAGACTTAGAAGCAAACCTTAAGAGTGTGTTGATAGTGCAGTATCTT
 AAAATTTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAAGGAGTG
 ATTACATGAACAAAAATATAAAATATTCTCAAACTTTTTAACGAGTGAAAAAGTACTCAACCAAA
 TAATAAAACAATTGAATTTAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGCA
 TTTAACGACGAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTAGACAGTCATCTAT

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9codYLR.

TCAACTTATCGTCAGAAAAATTA AAACTGAATACTCGTGTCACTTTAATTACCAAGATATTCTA
 CAGTTTCAATTCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATTGTTGGGAGTATTCCTTACCATTAAAGCAC
 ACAAATTATTA AAAAGTGGTTTTTGAAAGCCATGCGTCTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAAG
 GATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGCACACTCAAGTCTC
 GATTCAGCAATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAAACCAAAAAGTAAACAGTGTC
 TTAATAAACTTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAAATATTGGAAGCTATATACGTACTT
 TGTTTTCAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAA
 TGAACACGCCAAAGTAAACAATTTAAGTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGTCTATTTTTAAT
 AGTTATCTATTATTTAACGGGAGGAAATAATTCTATGAGTCGCTTTTGTAATTTGGAAAGTTAC
 ACGTTACTAAAGGGAATGTAGATAAATTATTAGGTATACTACTGACAGCTTCCAAGGAGCTAAA
 GAGGTCCCTAGCGCTCTTATCATGGGGAAGCTCGGATCATATGCAAGACAAAATAAACTCGCA
 ACAGCACTTGGAGAAATGGGACGAATCGAGAAAACCTCTTTACGCTGGATTACATATCTAATA
 AAGCCGTAAGGAGACGGGTTCAAAAAGGTTTAAATAAAGGAGAAGCAATCAATGCATTAGCTA
 GAATTATATTTTTTGGACAACGTGGAGAATTTAGAGAACGTGCTCTCCAAGACCAGTTACAAAG
 AGCTAGTGCATAAACATAATTATTAACGCTATAAGTGTGTGGAACACTGTATATATGGAAAAAG
 CCGTAGAAGAATTA AAAAGCAAGAGGAGAATTTAGAGAAGATTTAATGCCATATGCGTGGCCGTT
 AGGATGGGAACATATCAATTTTCTTGGAGAATACAAATTTGAAGGATTACATGACACTGGGCAA
 ATGAATTTACGTCCTTTACGTATAAAAGAGCCGTTTTATTCTTAATATAACGGCTCTTTTTATAGA
 AAAATCCTTAGCGTGGTTTTTTTTCCGAAATGCTGGCGGTACCCCAAGAATTAGAAATGAGTAG
 ATCAAATTATTCACGAATAGAATCAGGAAAATCAGATCCAACCATAAAAACACTAGAACAAATTG
 CAAAGTTAACTAACTCAACGCTAGTAGTGGATTTAATCCCAAATGAGCCAACAGAACCAGAACC
 AGAAACAGAATCAGAACAAGTAACATTGGATTTAGAAATGGAAGAAGAAAAAAGCAATGACTTC
 GTGTGAATAATGCACGAAATCGTTGCTTATTTTTTTTTAAAAGCGGTATACTAGATATAACGAAAC
 AACGAACTGAATAGAAACGAAAAAAGAGCCATGACACATTTATAAAATGTTTGACGACATTTTAT
 AAATGCATAGCCCGATAAGATTGCCAAACCAACGCTTATCAGTTAGTCAGATGAACTCTTCCCT
 CGTAAGAAGTTATTTAATTAACCTTTGTTTGAAGACGGTATATAACCGTACTATCATTATATAGGG
 AAATCAGAGAGTTTTCAAGTATCTAAGCTACTGAATTTAAGAATTGTTAAGCAATCAATCGGAAA
 TCGTTTGATTGCTTTTTTTGTATTCAATTTATAGAAGGTGGAGTTTGTATGAATCATGATGAATGTA
 AAAGTTATATAAAAAATAGTTTATTGGAGATAAGAAAATTAGCAAATATCTATACACTAGAAACGT
 TTAAGAAAGAGTTAGAAAAGAGAAATATCTACTTAGAAACAAAATCAGATAAGTATTTTTCTTCG
 GAGGGGGAAGATTATATATATAAGTTAATAGAAAATAACAAAATAATTTATTTCGATTAGTGGA
 AAAATTGACTTATAAAGGAAAAAAATCTTTTTCAAACATGCAATATTGAAACAGTTGAATGAAAA
 AGCAAACCAAGTTAATTAACAACCTATTTTATAGGATTTATAGGAAAGGAGAACAGCTGAATGA
 ATATCCCTTTTGTGTAGAACTGTGCTTCATGACGGCTTGTTAAAGTACAAATTTAAAAATAGT
 AAAATTCGCTCAATCACTACCAAGCCAGGTAAAAGCAAAGGGGCTATTTTTGCGTATCGCTCAA
 AATCAAGCATGATTGGCGGTCTGGTGTGTTCTGACTTCCGAGGAAGCGATTCAAGAAAATC
 AAGATACATTTACACATTGGACACCCAACGTTTATCGTTATGGAACGTATGCAGACGAAAACCG
 TTCATACACGAAAGGACATTCTGAAAACAATTTAAGACAAATCAATACCTTCTTTATTGATTTGA
 TATTCACACGGCAAAGAACTATTTTCAGCAAGCGATATTTAACAACCGCTATTGATTTAGGTT

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9codYLR.

TTATGCCTACTATGATTATCAAATCTGATAAAGGTTATCAAGCATATTTTGTGTTTAGAAACGCCA
 GTCTATGTGACTTCAAATCAGAATTTAAATCTGTCAAAGCAGCCAAAATAATTCGCAAATAT
 CCGAGAATATTTTGGAAAGTCTTTGCCAGTTGATCTAACGTGTAATCATTTTGGTATTGCTCGCA
 TACCAAGAACGGACAATGTAGAATTTTTTGATCCTAATTACCGTTATTCTTTCAAAGAATGGCAA
 GATTGGTCTTTCAAACAAACAGATAATAAGGGCTTTACTCGTTCAAGTCTAACGGTTTTAAGCG
 GTACAGAAGGCCAAAAACAAGTAGATGAACCCTGGTTTAATCTCTTATTGCACGAAACGAAATT
 TTCAGGAGAAAAGGGTTTAATAGGGCGTAATAACGTCATGTTTACCCTCTCTTTAGCCTACTTTA
 GTTCAGGCTATTCAATCGAAACGTGCGAATATAATATGTTTGAGTTTAATAATCGATTAGATCAA
 CCCTTAGAAGAAAAAGAAGTAATCAAATTGTTAGAAGTGCCTATTCAGAAAATCAAGGGG
 CTAATAGGGAATACATTACCATTCTTTGCAAAGCTTGGGTATCAAGTGATTTAACAGTAAAGAT
 TATTTGTCCGTCAAGGGTGGTTTAAATTCAGAAAAAAGAAGCGAACGTCAACGTGTTTCATT
 TGTCAGAATGGAAAGAAGATTTAATGGCTTATATTAGCGAAAAAAGCGATGTATACAAGCCTTA
 TTTAGTGACGACCAAAAAAGAGATTAGAGAAGTGCTAGGCATTCCTGAACGGACATTAGATAAA
 TTGCTGAAGGTACTGAAGGCGAATCAGGAAATTTCTTTAAGATTAAACCAGGAAGAAATGGTG
 GCATTCAACTTGCTAGTGTTAAATCATTGTTGCTATCGATCATTAAAGTAAAAAAGAAGAAAA
 GAAAGCTATATAAAGGCGCTGACAAATTCTTTTGAAGTATAGAGCATACTTCATTCAAGAGACTTT
 AAACAAGCTAGCAGAACGCCCTAAAACGGACACACAACCTCGATTTGTTTAGCTATGATACAGGC
 TGAATAAAACCCGCACTATGCCATTACATTTATATCTATGATACGTGTTTGTGTTTTCTTTGCT
 GTTTAGCGAATGATTAGCAGAAATATACAGAGTAAGATTTTAATTAATTATTAGGGGGAGAAGG
 AGAGAGTAGCCCGAAAACCTTTTAGTTGGCTTGGACTGAACGAAGTGAGGGAAAGGCTACTAAA
 ACGTCGAGGGGCAGTGAGAGCGAAGCGAACACTTGATTTTTTAATTTCTATCTTTTATAGGTC
 ATTAGAGTATACTTATTTGTCTATAAACTATTTAGCAGCATAATAGATTTATTGAATAGGTCATT
 TAAGTTGAGCATATTAGAGGAGGAAAATCTTGAGAAATATTTGAAGAACCCGATTACATGGAT
 TGGATTAGTTCTTGTGGTTACGTGGTTTTTAAGTAAAGTAGTGAATTTTTGATTTTTGGTGTGT
 GTGTCTTGTGTTAGTATTTGCTAGTCAAAGTGATTAAATAGAATTCCGGATGAGCATTATCAG
 GCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAA
 AAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCC
 TCAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTC
 CATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTA
 TTTCAATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTT
 GGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTC
 CGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTG
 TATGATGGTGTGTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTTCAGC
 TACTGACGGGGTGGTGCGTAACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTAT
 ACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTGAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAA
 AAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCTCGCTCACT
 GACTCGCTACGCTCGGTGCTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAG
 ATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAGCCGT
 TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGC

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9codYLR.

GAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCT
 CCTGTTCTCGCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCA
 CGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCC
 CGTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAAGACA
 TGCAAAAGCACCACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCAT
 GCGCCGGTTAAGGCTAACTGAAAGGACAAGTTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTAC
 CTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTT
 CGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCA
 GATAAAATATTTCTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGC
 AGCTGGCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAG
 TTAGTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA
 ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCATCGATA
 TCTAGATCTACGAAATCATCCTGTGGAGCTTAGTAGGTTTAGCAAGATGGCAGCGCCTAAATGT
 AGAATGATAAAAGGATTAAGAGATTAATTTCCCTAAAAATGATAAAACAAGCGTTTTTGAAAGCGC
 TTGTTTTTTTTGGTTTGCAGTCAGAGTAGAATAGAAGTATCAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCA
 CTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTTGAATGGTTCCAAC
 AAGATTATTTTATACTTTTATAACAAATAATCAAGGAGAAATTCAAAGAAATTTATCAGCCATAA
 AACAATACTTAATACTATAGAATGATAACAAAATAAACTACTTTTTTAAAGAATTTTGTGTTATAAT
 CTATTTATTATTAAGTATTGGGTAATATTTTTTGAAGAGATATTTTGAAAAAGAAAAATTAAAGCA
 TATTAACTAATTTTCGGAGGTCATTAATACTATTATTGAAATCATCAAACTCATTATGGATTTAAT
 TTAACTTTTTATTTTAGGAGGCCAAAATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCAC
 AAATAGCGTCGGATGGGCGGTGATCACTGATGAATATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGGTT
 CTGGGAAATACAGACCGCCACAGTATCAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGACAGTG
 GAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAACCGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAAG
 AATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTT
 TCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAAGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTT
 GGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAATCTATCATCTGCGAAAAAA
 ATTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGGATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTA
 AGTTTCGTGGTCATTTTTTGAATTGAGGGAGATTTAAATCCTGATAATAGTGATGTGGACAACTA
 TTTATCCAGTTGGTACAAACCTACAATCAATTATTTGAAGAAAACCCTATTAACGCAAGTGGAGT
 AGATGCTAAAGCGATTCTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCT
 CAGCTCCCCGGTGAGAAGAAAAATGGCTTATTTGGGAATCTCATTGCTTTGTCATTGGGTTTGA
 CCCCTAATTTTAAATCAAATTTTGATTTGGCAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAGATACTT
 ACGATGATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAATATGCTGATTTGTTTTTGGCA
 GCTAAGAATTTATCAGATGCTATTTTACTTTTCAGATATCCTAAGAGTAAATACTGAAATAACTAA
 GGCTCCCCTATCAGCTTCAATGATTAACGCTACGATGAACATCATCAAGACTTGACTCTTTTAA
 AAGCTTTAGTTTCGACAACAACCTCCAGAAAAGTATAAAGAAATCTTTTTTGATCAATCAAAAAAC
 GGATATGCAGGTTATATTGATGGGGGAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATAAATTTATCAAACCAA
 TTTTAGAAAAAATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAACTAAATCGTGAAGATTTGCTGCG

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9codYLR.

CAAGCAACGGACCTTTGACAACGGCTCTATTCCCCATCAAATTCACCTTGGGTGAGCTGCATGC
 TATTTTGAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTAAAAGACAATCGTGAGAAGATTGAAAAAA
 TCTTGACTTTTCGAATTCCTTATTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGCATG
 GATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGAAGTTGTGATAAAGGT
 GCTTCAGCTCAATCATTTATTGAACGCATGACAACTTTGATAAAAATCTTCCAAATGAAAAAGT
 ACTACCAAAACATAGTTTGCTTTATGAGTATTTTACGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAAAT
 ATGTTACTGAAGGAATGCGAAAACCAGCATTCTTTTCAGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTGA
 TTTACTCTTCAAAACAAATCGAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAGAAGATTATTTCAAAAAAAT
 AGAATGTTTTGATAGTGTTGAAATTTTCAGGAGTTGAAGATAGATTTAATGCTTCATTAGGTACCT
 ACCATGATTTGCTAAAAATTATTAAAGATAAAGATTTTTTGGATAATGAAGAAAATGAAGATATCT
 TAGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGAAGATAGGGAGATGATTGAGGAAAGACTTAAA
 ACATATGCTCACCTCTTTGATGATAAGGTGATGAAACAGCTTAAACGTCGCCGTTATACTGGTT
 GGGGACGTTTGTCTCGAAAATTGATTAATGGTATTAGGGATAAGCAATCTGGCAAAACAATATT
 AGATTTTTTGAATCAGATGGTTTTGCCAATCGCAATTTTATGCAGCTGATCCATGATGATAGTT
 TGACATTTAAAGAAGACATTCAAAAAGCACAAGTGTCTGGACAAGGCGATAGTTTACATGAACA
 TATTGCAAATTTAGCTGGTAGCCCTGCTATTAAAAAAGGTATTTTACAGACTGTAAAAGTTGTTG
 ATGAATTGGTCAAAGTAATGGGGCGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGGCACGTG
 AAAATCAGACAACCTCAAAAGGGCCAGAAAAATTTCGCGAGAGCGTATGAAACGAATCGAAGAAG
 GTATCAAAGAATTAGGAAGTCAGATTCTTAAAGAGCATCCTGTTGAAAATACTCAATTGCAAAAT
 GAAAAGCTCTATCTCTATTATCTCCAAAATGGAAGAGACATGTATGTGGACCAAGAATTAGATAT
 TAATCGTTTAAAGTGATTATGATGTCGATCACATTGTTCCACAAAGTTTCCTTAAAGACGATTCAA
 TAGACAATAAGGTCTTAACGCGTTCTGATAAAAATCGTGGTAAATCGGATAACGTTCCAAGTGA
 AGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAACTATTGGAGACAACCTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAA
 CGTAAGTTTGATAATTTAACGAAAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAACCTTGATAAAGCTGGTT
 TTATCAAACGCCAATTGGTTGAAACTCGCCAAATCACTAAGCATGTGGCACAAATTTTGGATAG
 TCGCATGAATACTAAATACGATGAAAATGATAAACTTATTCGAGAGGTTAAAGTGATTACCTTAA
 AATCTAAATTAGTTTCTGACTTCCGAAAAGATTTCCAATTCTATAAAGTACGTGAGATTAACAATT
 ACCATCATGCCCATGATGCGTATCTAAATGCCGTCGTTGGAAGTCTTTGATTAAGAAATATCC
 AAAACTTGAATCGGAGTTTGTCTATGGTGATTATAAAGTTTATGATGTTCTGATAAATGATTGCTA
 AGTCTGAGCAAGAAATAGGCCAAAGCAACCGCAAAATATTTCTTTTACTCTAATATCATGAACTTC
 TTCAAAACAGAAATTACACTTGCAAATGGAGAGATTTCGCAAACGCCCTCTAATCGAAACTAATG
 GGGAAACTGGAGAAATTGTCTGGGATAAAGGGCGAGATTTTGCCACAGTGCAGCAAAGTATTGT
 CCATGCCCCAAGTCAATATTGTCAAGAAAACAGAAGTACAGACAGGCGGATTCTCCAAGGAGT
 CAATTTTACCAAAAAGAAATTCGGACAAGCTTATTGCTCGTAAAAAAGACTGGGATCCAAAAAA
 ATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCTTATTCAGTCCTAGTGGTTGCTAAGGTGGAAAAA
 GGGAAATCGAAGAAGTTAAAATCCGTTAAAGAGTTACTAGGGATCACAATTATGGAAAGAAGTT
 CCTTTGAAAAAATCCGATTGACTTTTTTAGAAGCTAAAGGATATAAGGAAGTTAAAAAAGACTTA
 ATCATTAAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTAGAAAACGGTCGTAAACGGATGCTGGCTAG
 TGCCGGAGAATTACAAAAAGGAAATGAGCTGGCTCTGCCAAGCAAATATGTGAATTTTTTATAT

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pTRCas9codYLR.

TTAGCTAGTCATTATGAAAAGTTGAAGGGTAGTCCAGAAGATAACGAACAAAAACAATTGTTTG
 TGGAGCAGCATAAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGTGAATTTTCTAAGCGTGTT
 ATTTTAGCAGATGCCAATTTAGATAAAGTTCTTAGTG CATATAACAAACATAGAGACAAACCAAT
 ACGTGAACAAGCAGAAAAATATTATTCATTTATTTACGTTGACGAATCTTGAGCTCCCGCTGCTT
 TTAAATATTTTGATACAACAATTGATCGTAAACGATATACGTCTACAAAAGAAGTTTTAGATGCC
 ACTCTTATCCATCAATCCATCACTGGTCTTTATGAAACACGCATTGATTTGAGTCAGCTAGGAG
 GTGACTGAAGTATATTTTAGATGAAGATTATTTCTTAATAACTAAAAATATGGTATAATACTCTTA
 ATAAATGCAGTAATACAGGGGGCTTTTCAAGACTGAAGTCTAGCTGAGACAAATAGTGCGATTAC
 GAAATTTTTTAGACAAAAATAGTCTACGAGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAA
 CoppGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTTGTTGAGT
 TCCATGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGACTCCATTCAACATTGCCGATGATAACTTGAGA
 AAGAGGGTTAATACCAGCAGTCGGATACCTTCCTATTCTTTCTGTTAAAGCGTTTTTCATGTTATA
 ATAGGCAAAAAGAAGAGTAGTGTGATCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGAATTCAGTGGCCGT
 CGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACA
 TCCCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGT
 TGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAATCGATACGATTTTGAA

Tabelle 110: Full-Plasmid Sequenz von pNZrecTLR.

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pNZrecTLR.

ATGGCTATTAATAAATACTAAAGCTAGAAATTTTGGATTTTTATTATATCCTGACTCAATTCCTAAT
 GATTGGAAAGAAAAATTAGAGAGTTTGGGCGTATCTATGGCTGTCAGTCCTTTACACGATATGG
 ACGAAAAAAGATAAAGATACATGGAATAGTAGTGATGTTATACGAAATGGAAAGCACTATAA
 AAAACCACACTATCACGTTATATATATTGCACGAAATCCTGTAACAATAGAAAGCGTTAGGAACA
 AGATTAAGCGAAAATTGGGGAATAGTTCAGTTGCTCATGTTGAGATACTTGATTATATCAAAGG
 TTCATATGAATATTTGACTCATGAATCAAAGGACGCTATTGCTAAGAATAAACATATATACGACA
 AAAAAGATATTTTGAACATTAATGATTTTGATATTGACCGCTATATAACACTTGATGAAAGCCAA
 AAAAGAGAATTGAAGAATTTACTTTTAGATATAGTGATGACTATAATTTGGTAAATACAAAAGA
 TTTAATGGCTTTTATTCGCCTTAGGGGAGCGGAGTTTGAATTTTAAATACGAATGATGTAAAA
 GATATTGTTTCAACAACTCTAGCGCCTTTAGATTATGGTTTGAGGGCAATTATCAGTGTGGATA
 TAGAGCAAGTTATGCAAAGGTTCTTGATGCTGAAACGGGGGAAATAAAATGACAAACAAAGAAA
 AAGAGTTATTTGCTGAAAATGAGGAATTAAGGAAAGAAATTAAGGACTTAAAGAGCGTATTGAA
 AGATACAGAGAAATGGAAGTTGAATTAAGTACAACAATAGATTTATTGAGAGGAGGGATTATTG
 AATAAATAAAAGCCCCCTGACGAAAGTCGACGGCAATAGTTACCCTTATTATCAAGATAAGAA
 AGAAAAGGATTTTTCGCTACGCTCAAATCCTTTAAAAAACACAAAAGACCACATTTTTTAATGT
 GGTCTTTTATTCTTCACTAAAGCACCCATTAGTTCAACAAACGAAAATTGGATAAAGTGGGATA
 TTTTAAATATATATTTATGTTACAGTAATATTGACTTTTAAAAAGGATTGATTCTAATGAAGAA
 AGCAGACAAGTAAGCCTCCTAAATTCATTTAGATAAAATTTAGGAGGCATATCAAATGAACCTT
 TAATAAAATTGATTTAGACAATTGGAAGAGAAAAGAGATATTTAATCATTATTTGAACCAACAAA
 CGACTTTTAGTATAACCACAGAAATTGATATTAGTGTTTTATACCGAAACATAAAACAAGAAGGA

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pNZrecTLR.

TATAAATTTTACCCTGCATTTATTTTCTTAGTGACAAGGGTGATAAACTCAAATACAGCTTTTAGA
 ACTGGTTACAATAGCGACGGAGAGTTAGGTTATTGGGATAAGTTAGAGCCACTTTATACAATTT
 TTGATGGTGTATCTAAAACATTCTCTGGTATTTGGACTCCTGTAAAGAATGACTTCAAAGAGTTT
 TATGATTTATACCTTTCTGATGTTGAGAAATATAATGGTTCGGGGAAATTGTTTCCCAAACACC
 TATACCAGAAAATGCTTTTTCTCTTTCTATTATTCCTTGGACTTCATTTACTGGGTTTAACTTAAA
 TATCAATAATAATAGTAATTACCTTCTACCCATTATTACAGCAGGAAAATTCATTAATAAAGGTAA
 TTCAATATATTTACCGCTATCTTTACAGGTACATCATTCTGTTTGTGATGGTTATCATGCAGGAT
 TGTTTTATGAACTCTATTCAGGAATTGTCAGATAGGCCTAATGACTGGCTTTTATAATATGAGATA
 ATGCCGACTGTACTTTTTACAGTCGGTTTTCTAATGTCACTAACCTGCCCGTTAGTTGAAGAA
 GGTTTTTATATTACAGCTCCAGATCTAGTCTTATACTATACTGACAATAGAAACATTAACAAATC
 TAAACAGTCTTAATTCTATCTTGAGAAAGTATTGGTAATAATATTATTGTCGATAACGCGAGCA
 TAATAAACGGCTCTGATTAAATTCTGAAGTTTGTTAGATACAATGATTTTCGTTCAAGGAACTAC
 AAAATAAATTATAAGGAGGCACTCACCATGGGTACTGCAGAGATGAGTAATGATTTAACACAGG
 TGACACAACGATCTTTAGATGAACAAGTCATCGGAAATTTAAATAGATTGCAAGAGCAGGGATT
 AGAAATGCCACCAGGCTATAGCCCGCAGAATGCATTGAAAAGTGCTTTCTTTGAACTAACCAAC
 AATTCAGGAGGAAACCTTCTTCAGTTGGCAGCTAACAACCCTGAACTAAAACATCTATTTCTAA
 CGCGTTACTAGATATGGTCATCCAAGGATTATCACCAGCAAAAAACAATGTTATTTTATCAAGT
 ATGGAAATAAAGTCCAGCTTATGCGCTCATATTTTGAACCATGGCTGTATTAGATCGAGTAAC
 AGGAGGTGCAGAGATCACGCCTGTTGTAGTAAGAGAAGGCGATGTATTTGAAATTGCTATGGA
 CGGGCCCGACTTAGTTGTGGCTAAACATGAAACATCCTTCGAAAACCTAGACAACGACATCAA
 GGCTGCTTATGTGGTTATTAAGCTAGCAAATGGTAAAGAAGTAACAACGGTCATGACAAAGAAA
 CAAATTGATAAGTCATGGAGTAAAGCAAAAACAAAAAATGTTCAAAACGATTTCCCAGAAGAAAT
 GGCAAAAAGAACTGTCATCAATCGAGCTGCTAAATATTTAATCAATACTAGTAACGATAATGATT
 TATTTGTGCAAGCTGCTAAAGACACACTCGAAAATGAATTCGAACGAAAAGATGTGACACCAGA
 GCGAGAAGAGCAAGCTGCCGTACTCGAAGAAAAAATATTTACCAACAATAAAAAAGTTATTGAG
 CAAGAAAACGATATTGAACAAGCCAAACCAGTTGAAAAAGATGATTTAACGAAAGTGGCGGAC
 CAAATTTTAGAAGAACCAGTTCAGGAACTTTAGATGTGATGGCTGGTTATGAAACCAATCAGA
 AAGAGAGTGAAGCTGATGTCTCAACGATTGAAGAAGACGATTATCCTTTCTGATCTAGAGAGCT
 CAAGCTTTCTTTGAACCAAAAATTAGAAAACCAAGGCTTGAAACGTTCAATTGAAATGGCAATTAA
 ACAAATTACAGCACGTGTTGCTTTGATTGATAGCCAAAAAGCAGCAGTTGATAAAGCAATTACT
 GATATTGCTGAAAAATTGTAATTTATAAATAAAAAATCACCTTTTAGAGGTGGTTTTTTTATTTATA
 AATTATTCGTTTGATTTTCGCTTTTCGATAGAACAATCAAAGCGAGAATAAGGAAGATAAATCCCAT
 AAGGGCGGGAGCAGAATGTCCGAGACTAATGTAAATTTGTCCACCAATTAAGGACCGATAAC
 GCGAGCTTCTCGAGTGCATATTTTCGGCAATCTTCTCAATGAGATGCTCTTCAGCATGTTCAAT
 GATGTCGATTTTTTTATTAACAGTCTCAAAATCGTTTCTGAGACGTTTTAGCGTTTATTTCTGTTTA
 GTTATCGGCATAATCGTTAAAACAGGCGTTATCGTAGCGTAAAAGCCCTTGAGCGTAGCGTGG
 CTTTGCAGCGAAGATGTTGTCTGTTAGATTATGAAAGCCGATGACTGAATGAAATAATAAGCGC
 AGCGTCCTTCTATTTTCGGTTGGAGGAGGCTCAAGGGAGTTTGAGGGAATGAAATTCCCTCATG
 GGTTTGATTTTAAAAATTGCTTGCAATTTTGCCGAGCGGTAGCGCTGGAAAATTTTGAACAAAA

Full-Plasmid DNA-Sequenz 5'→3' des Plasmids pNZrecTLR.

TTTGGAATTTGGAAAAAATGGGGGGAAAGGAAGCGAATTTTGCTTCCGTACTACGACCCCC
ATTAAGTGCCGAGTGCCAATTTTTGTGCCAAAACGCTCTATCCCAACTGGCTCAAGGGTTTGA
GGGGTTTTTCAATCGCCAACGAATCGCCAACGTTTTTCGCCAACGTTTTTTATAAATCTATATTTA
AGTAGCTTTATTTTTGTTTTTATGATTACAAAGTGATACACTAATTTTATAAAATTATTTGATTGGA
GTTTTTTAAATGGTGATTTTCAAGATCGAAAAAAGAGTTATGATTTCTCTGACAAAAGAGCAAGA
TAAAAAATTAACAGATATGGCGAAACAAAAAGATTTTTTCAAATCTGCGGTTGCGGCGTTAGCT
ATAGAAGAATATGCAAGAAAGGAATCAGAACAAAAAAATAAGCGAAAGCTCGCGTTTTTAGAA
GGATACGAGTTTTTCGCTACTTGTTTTTGATAAGGTAATTATATC

Danksagung

Zuallererst möchte ich Frau Professor DI Dr. Agnes Weiß sehr herzlich für die Betreuung und die Möglichkeit, bei ihr im Arbeitskreis die Promotion zu absolvieren, danken. Ich habe mich sehr gefreut Mitglied der Arbeitsgruppe Lebensmittelmikrobiologie zu sein. Besonders dankbar bin ich Frau Professor DI Dr. Agnes Weiß für den wissenschaftlichen Austausch und die stets vorhandene Zeit für Gespräche und fachliche Diskussionen.

Herrn Professor Dr. Wolfgang Streit danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats und für die Möglichkeit, die Arbeitsräume der AG Streit zu nutzen. Bei den Doktorand*innen der AG Streit bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme und den wissenschaftlichen Austausch.

Meinen Student*innen Jasmin Saf, Laura Rumask, Annika Schuster und Luca Rudolph sowie den Praktikant*innen Gesa Valentiner, Adrian Brzezinski, Phil Grasl und Can Tiske möchte ich für ihr Engagement und ihre Begeisterungsfähigkeit für mein Promotionsthema danken.

Dr. Pablo Pérez-García danke ich sehr für die Unterstützung bei der Erstellung des Papers zur Genomsequenzierung der beiden Stämme.

Den Mitarbeiter*innen der AG Lebensmittelmikrobiologie und insbesondere meinen Doktorandenkolleg*innen Astrid Gędas, Jennifer Griesse und Tim Hoffmann möchte ich für die Unterstützung und den wissenschaftlichen Austausch danken.

Meinen Freunden, insbesondere Lizanne Schäfer und Melissa Broenhorst, danke ich für jegliche Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Ein besonderer Dank gilt auch Rabea Cordes, Marina Schlüsmeier-Hage und Victor Kisbye-Hansen für ihre Begleitung auf den letzten Metern der Promotion.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit und dass sie immer hinter mir standen und stehen.

Eidesstaatliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

Hamburg, den 09.04.2026

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Melina Mel'.

Datum, Unterschrift