

Gen-Editierung von Photorezeptorgenen in der
Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* mithilfe des
CRISPR/Cas9-Systems

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik
eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc. Simon Kelterborn

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Bernhard Grimm

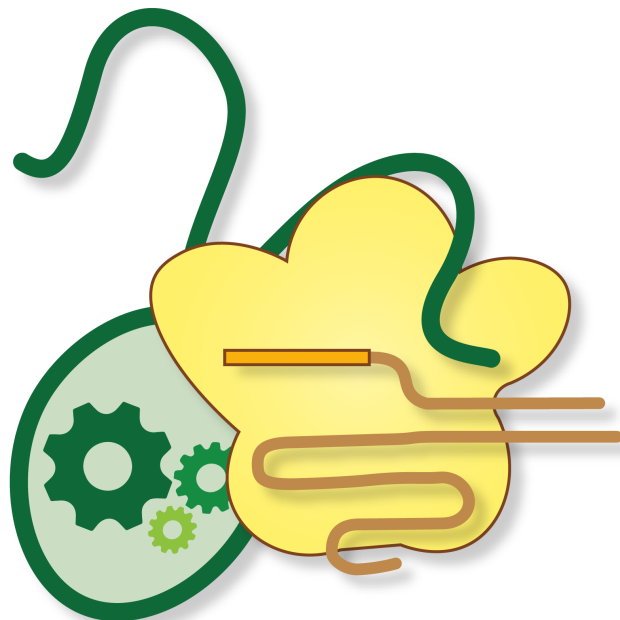
Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Peter Hegemann
2. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber
3. Prof. Dr. Jörg Nickelsen

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juni 2020

“Die Zeit der Eiche ist vorbei, jetzt ist die Zeit der Alge”

Friedrich Liechtenstein



Zusammenfassung

Die Modifikation von Genen ist in den molekularen Biowissenschaften ein fundamentales Werkzeug, um die Funktion von Genen zu studieren (Reverse Genetik). Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt 15 potenzielle Gene für Photorezeptoren, aber bisher konnte nur von wenigen die genaue Funktion beschrieben werden. Ein Hindernis bei der Erforschung der physiologischen Funktion von Genen in *C. reinhardtii* ist die Verfügbarkeit von Methoden zur reversen Genetik.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung von Techniken, um Gene im Kerngenom von *C. reinhardtii* gezielt auszuschalten und präzise zu verändern. Grundlage solcher Techniken sind programmierbare Nukleasen, die DNA-Doppelstrangbrüche im Zielgen auslösen. Mithilfe unterschiedlicher Methoden, wie dem *aphVIII*-Nuklease-Selektionssystem oder dem „Blau-Grün“-Test für Mutationen, konnten Zinkfinger- und CRISPR/Cas9-Nukleasen erfolgreich in *C. reinhardtii* angewendet werden.

Basierend auf vorausgegangener Arbeit mit Zinkfinger-nukleasen (ZFN) konnte die Transformationseffizienz um das 300-fache verbessert werden, was die Inaktivierung von Genen auch in motilen *Wildtyp*-Zellen ermöglichte. Damit war es möglich, die Gene für das Kanalrhodopsin-1 (ChR1) und Kanalrhodopsin-2 (ChR2) einzeln und gemeinsam auszuschalten. Eine Analyse der Phototaxis in diesen Stämmen ergab, dass die Phototaxis durch Inaktivierung von ChR1 stärker beeinträchtigt ist als durch Inaktivierung von ChR2. Aber nur bei gleichzeitiger Inaktivierung beider Kanalrhodopsine ist überhaupt keine phototaktische Antwort mehr messbar. Außerdem wurden drei neue ZFN-Paare für das *Chlamyopsin-1/2*-Gen evaluiert, wobei eines der Paare eine effiziente Mutationsrate von bis zu 8 % aufwies (im Vergleich zu 1 % in bisherigen Studien).

Im Gegensatz zu anderen Organismen zeigte sich in *C. reinhardtii*, dass Mutationen meist durch die Insertion längerer DNA-Abschnitte induziert wurden. Deshalb wurde ein Protokoll entwickelt, das mithilfe einer „FLAG“-Markierungssequenz kürzere Insertionen generiert und die Identifikation von Mutanten erleichtert. Durch die Verwendung von Oligonukleotiden als Donor-DNA konnten die Experimente zusätzlich beschleunigt werden.

Beim CRISPR/Cas9-System handelt es sich um programmierbare Nukleasen, deren Zielsequenz durch eine interagierende RNA bestimmt wird (gRNA). Dadurch lassen sich neue Zielsequenzen leicht vorhersagen und anpassen, was die Handhabung stark vereinfacht und einen großen Vorteil gegenüber den ZFNs darstellt. Da sich die Expression der großen (158 kDa) Cas9-Nuklease in der Algenzelle als schwierig herausstellte, wurden die Transformationsbedingungen so angepasst und optimiert, dass der Cas9-gRNA-Komplex als *in vitro* hergestelltes Ribonukleoprotein in die Zellen transformiert werden konnte. Dieses Protokoll ermöglichte die Verwendung von CRISPR-Nukleasen in *C. reinhardtii* und erlaubt die robuste Inaktivierung und Modifikation von Genen. In dieser Arbeit konnten mehr als 20 nicht-selektierbare Gene – darunter 10 der 15 potenziellen Photorezeptorgene – mit einer durchschnittlichen Mutationsrate von 12,1 % inaktiviert werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf präzise Genveränderungen gelegt. Kleine Insertionen von bis zu 30 bp konnten mit kurzen 90 bp Oligonukleotiden eingefügt werden. Anhand des *ChR2* und *COP1/2*-Gens konnten präzise Insertionen von zwei Reportergenen (*mVenus*, *SNAP-Tag*) mithilfe eines Donor-Plasmids generiert werden. Um die Bedingungen für präzise Genmodifikationen zu messen und zu verbessern, wurde das *SNRK2.2*-Gen als Reportergen für Mutationen etabliert. Der „Blau-Grün“-Test kann Mutanten durch einen phänotypischen Assay identifizieren und so das Mutantenscreening beschleunigen. Dies ermöglichte den Vergleich verschiedener Transformationsbedingungen und die Messung der HDR-Rate in mehreren WT-Stämmen.

Insgesamt zeigt diese Arbeit in umfassender Weise, wie Gen-Inaktivierungen und -Modifikationen mithilfe von ZFNs und des CRISPR/Cas9-Systems in der Grünalge *C. reinhardtii* durchgeführt werden können. Außerdem bietet die Sammlung der zehn Photorezeptor-Knockouts eine aussichtsreiche Grundlage, um die Vielfalt der Photorezeptoren in *C. reinhardtii* zu erforschen.

Abstract

Gene editing is a fundamental tool in molecular biosciences in order to study the function of genes (reverse genetics). The genome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* possesses 15 genes that potentially code for photoreceptors but for only six of them, a physiological function is known. One obstacle to study these photoreceptors is the availability of methods to inactivate genes of interest in the nuclear genome of green algae.

This study deals with the establishment of gene editing techniques to target and inactivate the photoreceptor genes in *C. reinhardtii*. The basis for gene editing experiments are programmable nucleases that induce DNA double-strand breaks at the gene of interest. Using different methods, such as the *aphVIII*-selection system for nucleases or the "blue-green" screen for mutants, zinc-finger and CRISPR/Cas9 nucleases were successfully applied in *C. reinhardtii*.

In continuation of previous work with designer zinc-finger nucleases (ZFN), the transformation efficiency could be increased by a factor of three hundred, which enabled the inactivation of genes in motile wild type cells. This made it possible to disrupt the Channelrhodopsin-1 (ChR1) and Channelrhodopsin-2 (ChR2) genes individually and in parallel. Phototaxis experiments in these strains revealed that the inactivation of ChR1 had a greater effect on phototaxis than the inactivation of ChR2. But only if both Channelrhodopsins were inactivated, the phototactic response was completely obliterated. In addition, three new ZFN pairs targeting the *Chlamyopsin-1/2* gene were tested with one of the ZFN pairs exhibiting efficient mutation rates of up to 8 % (compared to 1 % in previous work).

In contrast to gene editing experiments in other organisms, mutations generated in *C. reinhardtii* were mostly the result of the insertion of longer DNA fragments at the target site. Therefore, a protocol was developed that uses a "FLAG"-sequence to generate shorter insertions facilitating the identification of mutants. The use of short oligonucleotides as donor DNA showed equally good mutation rates and further simplified the experimental handling.

CRISPR/Cas9 is a programmable nuclease whose target sequence is determined by an interacting guide RNA (gRNA). This makes it easy to adapt the Cas9 nucleases to new target sequences, which greatly simplifies the handling and is a major advantage over ZFNs. Since the expression of the large (158 kDa) Cas9 nuclease in algal cells turned out to be difficult, the transformation conditions were adapted and optimized so that the Cas9-gRNA complex was successfully electroporated into the cells as an *in vitro* synthesized ribonucleoprotein. This approach enabled gene inactivations with CRISPR/Cas9 in *C. reinhardtii*. Throughout this study, more than 20 non-selectable genes were disrupted, including 10 of the photoreceptor genes, with an average mutation rate of 12,1 %.

Furthermore, a special focus was put on precise gene modifications. Small in-frame insertions of up to 30 bp were successfully demonstrated using short 90 bp oligonucleotides as donor DNA substrate. For two genes, *ChR2* and *COP1/2*, the precise insertion of two

reporter genes (*mVenus*, *SNAP-tag*) was demonstrated using plasmids as donor DNA. In order to measure and improve the conditions for precise gene modifications, the *SNRK2.2* gene was established as a reporter gene for mutations. The "blue-green" test can identify mutants using a phenotypic assay and thus accelerates the mutation screening. This allowed to compare different transformation conditions and the measurement of the HDR-rate of several WT strains.

Overall, this work shows in a comprehensive way how gene inactivations and modifications can be performed in green alga *C. reinhardtii* using ZFNs or CRISPR/Cas9. In addition, the collection of the ten photoreceptor knockouts provides a promising source to investigate the diversity of photoreceptor genes in *C. reinhardtii*.

Herzlichen Dank!

Diese Arbeit wäre nicht ohne die Hilfe und Unterstützung einiger Menschen möglich, bei denen ich mich ganz herzlich bedanken möchte! Die inhaltlichen und methodischen Grundlagen, die mich durch diese Promotion führten, wurden durch mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München geschaffen. Hierbei hat mich erstens die Teilnahme an dem *iGEM* Wissenschaftswettbewerb für Synthetische Biologie geprägt, bei dem Prof. Thorsten Mascher unser Team betreut und meine Neugierde auf die Wissenschaft entfacht hat. Zweitens wurde mein Interesse an Grünalgen durch Prof. Jörg Nickelsen geweckt, der mir die Möglichkeit gab, meine Masterarbeit über die Anwendung von Cas9 in Grünalgen zu schreiben – das Thema, welches mich zur Promotion nach Berlin führte.

In Berlin wurde ich seit 2014 von meinem Doktorvater Prof. Peter Hegemann unterstützt, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Projekt zu arbeiten und mir somit die spannende Chance gab, ein neues Labor und eine Mikroskopie-Bild neue Stadt kennen zu lernen. Ich möchte mich besonders für dein Vertrauen bedanken, Peter, das mir die Freiheit gab, neue Sachen auszuprobieren und eigenen Gedanken zu folgen. Ich habe bei dir aber auch gelernt, den Fokus nicht aus den Augen zu verlieren. Und du hast mir gezeigt, dass es sich lohnt, an den großen Zielen festzuhalten, auch wenn der Weg dorthin steinig sein kann.

Besonders gefallen hat mir die Zusammenarbeit mit Kollegen. An dieser Stelle möchte ich mich bei dem gesamten aktuellen und ehemaligen Chlamy-Team danken: Bei Andre Greiner und Irina Sizova für die Weitergabe ihrer langjährigen Erfahrung mit programmierbaren Nukleasen und Algen-Methoden. Bei Heide Evers, der Säule im Chlamy-Team, die sich so vorbildlich um die Stammsammlung gekümmert hat, aber vor allem auch um die Teamzusammengehörigkeit. Vielen Dank, dass du nicht die Geduld verloren hast, mir zu helfen, mein Chaos in Zaum zu halten. Weiterhin danke ich meinen Hiwi-Studentinnen Mirjam Langenegger und Francisca Boehning für das Durchführen unzähliger Experimente und das Picken Tausender Klone. Ich danke meinen Studenten wie Erik Zschieschang, die mich immer mit neuen Ideen inspiriert und dem *Chlamylicious* HU *iGEM*-Team 2019, die mir wieder vorgelebt haben, wie spannend Wissenschaft ist und dass man sich durch „geht nicht“ Sätze nicht abhalten lassen sollte, etwas zu versuchen. Danke auch an Olga Badukova, die als Physikerin neue Blickwinkel ins Chlamy-Team brachte. Vielen Dank an Thi Bich Thao Nguyen für die exzellente Aufreinigung des Cas9-Proteins, das diese Arbeit erst ermöglichte.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Betreuerin Dr. Lina Sciesielski. Lina hat sich nicht nur während ihrer Mitarbeit in der AG Hegemann um mich gekümmert, sondern auch darüber hinaus in ihrer neuen Position als Laborleiterin an der Charité. Sie wurde meine Mentorin und Vorbild für effizientes Experimentieren, gutes wissenschaftliches Arbeiten und Argumentieren, für die Organisation im Labor sowie für die Betreuerrolle. Vielen Dank für deine stetige Unterstützung – auch beim Erstellen und Korrekturlesen dieser Arbeit!

Ein Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit geht außerdem an meine Tante Maya, meine Schwiegermutter Cordula und an die Optos.

Natürlich wären die letzten Jahre im Labor ohne all die Kollegen der AG Hegemann nicht halb so lebenswert gewesen. Danke, dass ihr mich alle so freundlich aufgenommen habt und mir so eine nette Gemeinschaft wurdet. Besonders möchte ich den Optos Roman, Uli und Benni danken, die nicht nur gute Kollegen waren, sondern zu guten Freunden wurden. Ihr Optos sowie die anderen neuen und alten Berliner Freunde (Tim, Paula, Felix, Julia, Nils...) habt dazu beigetragen, dass Berlin mein neues Zuhause geworden ist.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Frau Maud danken. Sie hat die Zeit neben der Doktorarbeit unvergesslich gemacht und ich danke ihr für die Geduld, die sie für mich aufbrachte, wenn ich mal wieder in der Forschungsarbeit versunken war und zu spät zu einer Verabredung kam.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Grünalge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.....	1
1.1.1 Die Entwicklung zum Modellorganismus	1
1.1.2 Die Architektur der Zelle.....	4
1.1.3 Übersicht über die Photorezeptoren.....	6
1.2 Programmierbare Nukleasen als Werkzeug für Genmanipulationen	13
1.2.1 Die Entwicklung programmierbarer Nukleasen.....	13
1.2.2 Das CRISPR-Abwehrsystem	15
1.2.3 Die Anwendung von CRISPR/Cas9 als RNA-bindende Designernuklease	16
1.3 Anwendung des CRISPR-Systems in <i>Chlamydomonas</i>.....	22
1.3.1 Bisheriger Fortschritt in der reversen Genetik in <i>C. reinhardtii</i>	22
1.3.2 CRISPR in <i>C. reinhardtii</i>	23
1.4 DNA-Reparatursysteme.....	24
1.4.1 Einzelbasen-Reparaturen.....	24
1.4.2 Nicht- und mikrohomologe DSB-Reparaturen.....	25
1.4.3 Homologie-vermittelte DSB-Reparaturen	26
1.4.4 Beeinflussung der Reparatursysteme und Mutationsraten.....	28
1.5 Zielsetzung	29
2 METHODEN	30
2.1 Materialien	30
2.1.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Software	30
2.1.2 <i>E. coli</i> -Zelllinien.....	32
2.1.3 Algenstämme, Medien und Kulturbedingungen.....	32
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.1 Plasmide und Oligonukleotide	35
2.2.2 Klonierung neuer Zielsequenzen in die <i>aphVIII</i> -Reparatur-Kassette.....	36
2.2.3 Design und Klonierung der <i>COP1/2</i> -Zinkfinger-Nuklease-Plasmide	38
2.2.4 Herstellung von rekombinantem Cas9-Protein	40
2.2.5 Design und Verwendung der guide RNAs.....	41
2.2.6 Donor-DNAs	42
2.3 Transformation von <i>C. reinhardtii</i>-Zellen.....	44
2.3.1 Transformationen mit dem <i>aphVIII</i> *-Testsystem.....	44
2.3.2 Geninaktivierungen durch Elektroporation von ZFN-Plasmiden.....	45
2.3.3 Geninaktivierungen mit Cas9-RNPs.....	46
2.3.4 Screening von <i>C. reinhardtii</i> -Mutanten	51
2.4 Phototaxis-Assay.....	56
3 ERGEBNISSE.....	59
3.1 Geninaktivierung mittels Zinkfingernukleasen	59
3.1.1 Das <i>aphVIII</i> -Reparatursystem zum Testen von Nukleasen.....	59
3.1.2 Verwendung von ZFN in motilen <i>C. reinhardtii</i> -Stämmen.....	61

3.1.3	Identifikation von Geninaktivierungen mittels FLAG-Sequenz	64
3.1.4	Geninaktivierung nicht-selektierbarer Gene mit Zinkfingernukleasen.....	66
3.1.5	Kanalrhodopsin-1 ist hauptverantwortlich für Phototaxis.....	69
3.2	Gen-Veränderung mit CRISPR/Cas9	71
3.2.1	Cas9 als synthetisches Ribonukleoprotein ist funktionell in <i>C. reinhardtii</i>	72
3.2.2	Inaktivierung nicht-selektierbarer Gene mit CRISPR/Cas9.....	74
3.2.3	Einführung von Fluoreszenz- und Markerproteinen	78
3.3	Verbesserung der homologen DNA-Reparatur	80
3.3.1	Analyse der Transformationsbedingungen durch den Blau-Grün-Test	81
3.3.2	Analyse der Homologie-vermittelten Reparatur	84
4	DISKUSSION.....	86
4.1	Wichtige Parameter für Experimente mit Cas9-RNPs in <i>C. reinhardtii</i>	86
4.2	Verbesserung der Mutationsrate	91
4.3	Photorezeptoren in <i>C. reinhardtii</i>	98
5	APPENDIX.....	104
	Literaturverzeichnis.....	104
	Abbildungsverzeichnis	119
	Tabellenverzeichnis	121
	Publikationsliste	122
	Zusätzliche Tabellen.....	123
	Eigenständigkeitserklärung	136

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
CRISPR	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cas	engl. <i>CRISPR-associated protein</i>
Cas9	engl. <i>CRISPR-associated protein 9</i> (Klasse 2, Typ II)
Cas12a	engl. <i>CRISPR-associated protein 12a</i> (Klasse 2, Typ V-A)
crRNA	CRISPR-RNA
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	engl. <i>double-strand break repair</i> (Doppelstrangbruch-Reparatur)
FPKM	engl. <i>fragments per kilobase of transcript per million mapped reads</i>
gRNA	engl. <i>guide RNA</i> (Leit-RNA)
HDR	engl. <i>homology-directed repair</i> (Homologie-vermittelte Reparatur)
HR	engl. <i>homologous recombination</i> (homologe Rekombination)
IPTG	Isopropyl- β -D- thiogalactopyranosid
MIT	engl. <i>Massachusetts Institute of Technology</i>
MMEJ	engl. <i>microhomology-mediated end joining</i> (Mikrohomologie-vermittelte Endverknüpfung)
MMR	engl. <i>mismatch repair</i>
MRN-Komplex	Komplex aus <u>MRE11</u> , <u>RAD50</u> und <u>NBS1</u>
NHEJ	engl. <i>non-homology end-joining</i> (nicht-homologe Endverknüpfung)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nt	Nukleotid
PAM	engl. <i>protospacer adjacent motif</i>
PTO	Thiophosphorsäureester-Schutzbindung
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SDSA	engl. <i>synthesis-dependent strand-annealing</i> (Synthese-abhängige Strang-Paarung)
SSA	engl. <i>single-strand annealing</i> (Einzelstrang-Paarung)
tracrRNA	engl. <i>trans-activating crRNA</i>
WT	Wildtyp
ZF	Zinkfinger
ZFN	Zinkfingernukleasen

Kurzschreibweisen von Organismennamen

<i>As</i>	<i>Acidaminococcus sp. BV3L6</i>
<i>Lb</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium ND2006</i>
<i>Sa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Sp</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

Kurzschreibweise von DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
R	A, G
W	A, T
D	A, G, T
H	A, C, T
V	A, C, G
N	A, C, G, T



1 Einleitung

1.1 Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

1.1.1 Die Entwicklung zum Modellorganismus

Die Erforschung der Welt der Mikroorganismen begann mit der Entwicklung der ersten Mikroskope im 17. Jahrhundert. So beschrieb Antoni van Leeuwenhoek (* 1632; † 1723) mit seinem „einfachem Mikroskop“ erstmals Bakterien und Robert Hooke (* 1635; † 1703) sah zum ersten Mal mit einem „zusammengesetzten Mikroskop“, dass sein Flaschenkorken aus einzelnen Zellen bestand (Hooke 1665; Gest 2004). Die ersten Algen und Einzeller wurden in „*Animalcula infusoria, fluviatilia et marina*“ (Kleinsttiere der Infusorien, der Flüsse und der Meere) durch den Dänen Otto Frederik Müller (* 1730; † 1784) beschrieben (Müller 1786). Kurz darauf wurden auch schon die phototaktischen Experimente zur „*Bewegung der Grünen Materie im Pflanzenreich*“ von Ludolf Christian Treviranus (* 1779; † 1864) mit Zoosporen der filamentösen Alge *Conferva mutabilis* (heute *Draparnaldia mutabilis*) durchgeführt und dokumentiert. Proben dieser Alge zeigten „*an der dem Fenster zugekehrten, wegen [des] erhöhten Randes der Tasse dunkleren Seite ein[en] grüne[n] Schein [...]*“ (Treviranus 1817). Nach Drehung der Tasse um 180° ordneten sich die Sporen neu an, es handelte sich also tatsächlich um eine am Licht ausgerichtete Bewegung – Phototaxis. Diese Entdeckung führte zu Diskussionen, da man bisher zwischen sich bewegenden Tieren und sesshaften Pflanzen klassifizierte. Christian Gottfried Ehrenberg (* 1795; † 1876) beschrieb die „*Infusionsthierchen als vollkommene Organismen*“. Dazu zählte er auch die von ihm neu klassifizierte Art *Chlamidomonas pulvisculus*: „*Diese nun mit Bewegungsorganen, Augen, Eiern, Samendrüsen und Magen zellen versehenen Staubmonaden sind [...] hier als vollendete, mit Pflanzen in gar keiner Beziehung stehende, Thiere angesehen*“ (Ehrenberg 1838) (Abbildung 1.1 A+B). Ehrenberg beobachtete, dass die Tochterzellen dieser Art nach einer Zellteilung noch für eine Weile in einer „Hülle“ verbleiben und führte deshalb den Genus „*Chlamidomonas*“ (Staubmonade) ein (Ehrenberg 1834).

Mit *Chlamidomonas pulvisculus* studierte Andrei Famintzin (* 1835; † 1918) in St. Petersburg die Bewegung der Zellen im Licht und stellte fest, dass sich diese Algen in einem Lichtgradienten einsortierten: Eine Untertasse mit Algen wurde zur Hälfte mit einem Brettchen bedeckt ins direkte Sonnenlicht ans Fenster gestellt. Bereits nach wenigen Minuten ordneten sich die Algen in einem Streifen unter dem Brettchen an der Grenze zum

beleuchteten Teil der Tasse an (Famintzin 1866). Aus diesen Beobachtungen leitete Famintzin ab, dass die Algen Starklicht und Dunkelheit mieden. Damit wurde erstmals gezeigt, dass eine Zelle gleichzeitig die Fähigkeit für positive Phototaxis (gerichtete Bewegung zum Licht hin) und negative (gerichtete Bewegung vom Licht weg) besitzt und darüber *entscheiden* kann. Außerdem stellte Famintzin fest, dass sich die Phototaxis reduzierte, wenn die Experimente mit „Newa“-Flusswasser (Flussmündung vor St. Petersburg) durchgeführt wurden, anstelle des „Pfüten“-Wassers, in dem er die Algen isolierte. Die Phototaxis lässt sich also durch die Medienzusammensetzung beeinflussen (Abbildung 1.1 C).

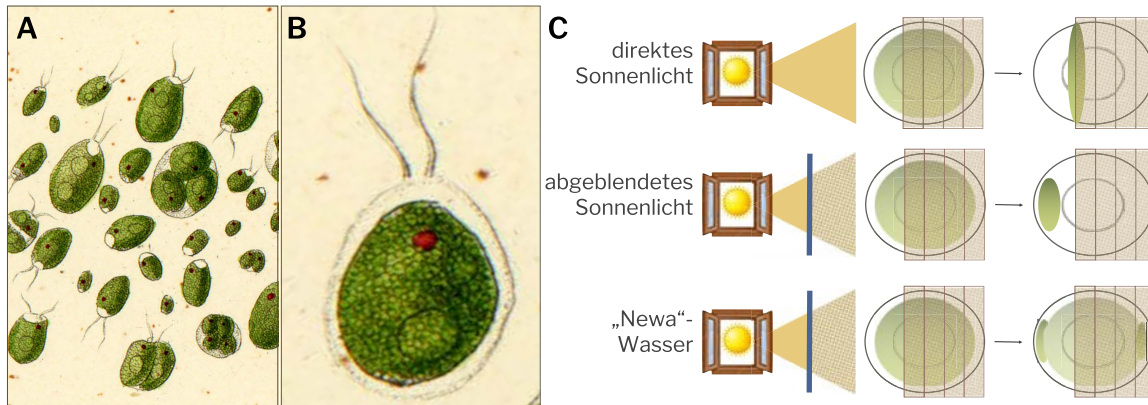


Abbildung 1.1: Historische Experimente an Grünalgen.

A+B) Handzeichnung von *Chlamidomonas pulvisculus* von Christian Gottfried Ehrenberg, der den Genus „Chlamidomonas“ einführt und detaillierte Farbtafeln der Algenzellen erstellt (Ehrenberg 1838). (A) Ausschnitt der Farbtafel III in Originalgröße. Isolate von 1832 aus Berlin. (B) Isolat von 1834 aus Berlin, 3,5-mal vergrößert. Die Abbildung ist gemeinfrei (Public Domain) **C)** Erste dokumentierte Phototaxis-Experimente an *Chlamidomonas pulvisculus*, die „einer grossen Pfüte auf Wassili-Ostrow, am grossen Prospekt auf dem Smolenskischen Felde“ entnommen wurden (Famintzin 1866). Die Phototaxis ist abhängig von der Lichtstärke und dem Medium. Newa ist ein Fluss, der St. Petersburg durchquert. Abbildung ist in Deisseroth & Hegemann (2017) erschienen und mit Genehmigung der AAAS reproduziert.

Neben der Phototaxis weckte ein weiteres Phänomen das Interesse an Algen. Die zwei Forscher Iwan Nikolajewitsch Goroschankin (* 1848; † 1904) und Ludwig Reinhardt beobachteten die Lebenszyklen von Algen und Zoosporen und entdeckten in *C. pulvisculus* auch eine sexuelle Zellteilung (Reinhardt 1876; Goroschankin 1905). Da sich allerdings die Beschreibungen von Goroschankin und Reinhardt in der Formation der Tochterzellen unterschieden, schrieb Pierre Augustin Dangeard (* 1862; † 1947) die von Reinhardt beschriebenen Phänomene einer neuen Spezies zu und taufte sie *Chlamydomonas reinhardtii* (Dangeard 1888). Da sich unter *C. pulvisculus* verschiedene Arten befanden, wurde diese Bezeichnung obsolet und später als illegitim eingestuft, während *C. reinhardtii* als neuer Prototyp für *Chlamydomonas* galt (Pröschold & Silva 2007).

Die Experimente zur Phototaxis von Organismen wurden in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts fortgesetzt, infolgedessen weitere phototaktische Organismen identifiziert wurden. Im Jahr 1960 waren bereits 170 phototaktische Organismen bekannt (Bendix 1960). Damals wusste man, dass der Augenfleck eine wichtige Rolle spielte, aber es konnte noch nicht erklärt werden, wie Organismen ohne erkennbare Strukturen zu Phototaxis fähig

waren (Mast 1927). Weiterhin wurde festgestellt, dass das Ausmaß der Phototaxis von der Wellenlänge abhängt und sich das Maximum z. B. bei *Eudorina elegans*, *Volvox minor* und *Chlamydomonas* bei ca. 490 nm befindet (Luntz 1931a,b).

Bis zu den Arbeiten von Frank Moewus (* 1908; † 1959) über den sexuellen Lebenszyklus von Algen, erfuhr *Chlamydomonas reinhardtii* keine größere Aufmerksamkeit durch die Wissenschaftsgemeinde. Das änderte sich, als Moewus postulierte, ein geschlechtsspezifisches Hormon „Crocetin“ in *Chlamydomonas* identifiziert zu haben, das zur Ausbildung von Gameten unterschiedlichen Geschlechts führe (Moewus 1938). Des Weiteren hätte er 42 „erbliche Eigenschaften“ entdeckt, die die Konsequenz je eines Enzyms wären (Moewus 1940a,b). Damit hatte er ein Jahr vor den Nobelpreisträgern George Wells Beadle (* 1903; † 1989) und Edward Lawrie Tatum (* 1909; † 1975) die *Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese* formuliert (Beadle & Tatum 1941). Die Arbeiten von Moewus stellten sich aber als Fälschungen heraus, da sie weder durch andere noch durch ihn selber vor Zeugen reproduziert werden konnten (Sapp 1987). Dennoch erkannte man das Potenzial eines einzelligen Organismus, der zur sexuellen Fortpflanzung und damit zur Kreuzung von Stämmen in der Lage ist, um damit die Biochemie zwischen Genotyp und Phänotyp zu erforschen. Auch Gilbert M. Smith (* 1885; † 1959), Professor an der *Stanford University*, nahm die Arbeit zur Sexualität bei *Chlamydomonas* auf und isolierte auf dem Kartoffelacker seiner Heimatstadt in Amherst, Massachusetts, *C. reinhardtii* Zygoten – Zellen, die sich gerade in der sexuellen Teilung befinden (Smith & Regnery 1950). Eines dieser Isolate „137c“ sollte die Grundlage für die kommende Forschung an *C. reinhardtii* werden. Bis heute werden weltweit fast ausschließlich Laborstämme verwendet, die Nachfahren dieses Isolats sind (Harris 2001; Proschold 2005; Gallaher *et al.* 2015). In den folgenden Jahrzehnten begannen Ralph A. Lewin (* 1921; † 2008) am *Scripps Oceanographic Institute*, Ruth Sager (* 1918; † 1997) an der *Rockefeller University*, Bill T. Ebersold (* 1928; † 2009) am *Dartmouth College* und Paul Levine an der *Harvard University*, die Genetik von *C. reinhardtii* zu studieren (Ebersold *et al.* 1962; Goodenough 2015). Diese Forscher leisteten Pionierarbeit bei der Entwicklung genetischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden und legten damit den Grundstein zur Etablierung von *C. reinhardtii* als Modellorganismus. Mit dem ersten *Chlamydomonas Meeting* 1983 in *Cold Springs Harbour* startete eine erfolgreiche internationale Konferenzserie, die seit 1984 alle zwei Jahre stattfindet und zur Bildung einer engen Forschergemeinschaft beitrug.

1.1.2 Die Architektur der Zelle

Das große Interesse für die Grünalge lag aber auch an ihrer einzigartigen Zellarchitektur und ihren erwähnenswerten biologischen Eigenschaften (Abbildung 1.2):

- (1) *C. reinhardtii* besitzt einen vegetativen und einen sexuellen Lebenszyklus. In der vegetativen Phase liegt das Genom haploid vor (nur eine Kopie des Chromosomensatzes) und Genmutationen führen zur direkten Expression des Phänotyps. Der sexuelle Lebenszyklus hingegen erlaubt das Kreuzen von Stämmen und somit das Kombinieren mehrerer Genotypen. Dies ermöglichte die Erstellung der erster Genkarten in einzelligen Eukaryoten, bevor Methoden zur DNA-Sequenzierung entwickelt wurden.
- (2) Kulturen von *C. reinhardtii* können sehr einfach im Labor gehalten werden: unter optimalen Lichtbedingungen wachsen sie mit einer Verdopplungszeit von 8 h (Harris 2001). Außerdem ist *C. reinhardtii* unter Zugabe von Acetat als Kohlenstoffquelle in der Lage, unabhängig von der Photosyntheseaktivität – also auch in völliger Dunkelheit – zu wachsen. Anders als bei höheren Pflanzen werden die Photosysteme auch in Dunkelheit voll ausgebildet. Das ermöglicht die Isolierung von Photosynthesemutanten, die in höheren Pflanzen letal wären (Levine 1969).
- (3) Der Aufbau der Flagellen ist identisch mit Säugetier-Zilien und somit können Zilien-assoziierte Krankheitsbilder im menschlichen Körper analysiert werden (Snell et al. 2004).
- (4) Die Größe der Algenzelle (10 µm) mit der stützenden Zellwand und dem Durchmesser der Flagellen (0,2 µm) machen die Algenzelle zu einem optimalen Objekt für hochauflösende (*superresolution*) Mikroskopie (Hamel et al. 2017; Iwai et al. 2018).
- (5) Schließlich ist das Genom von *C. reinhardtii* vollständig sequenziert (Merchant et al. 2007) und es wurden Methoden etabliert, um das Kern- (Kindle 1990), das Chloroplasten- (Boynton et al. 1988) und das Mitochondriengenom (Remacle et al. 2006) transformieren zu können.

Diese Eigenschaften führten dazu, dass sich *C. reinhardtii* als Modell für Grünalgen und zur Erforschung unterschiedlichster biologischer Fragestellungen entwickelte. Seit über 50 Jahren wird an der Struktur der Flagellen (Witman et al. 1972; Dutcher 1995; Lehtreck 2015), des sexuellen Lebenszyklus (Goodenough et al. 2007) und der Photosynthese (Rochaix 1995) geforscht. Weitere Forschungsgebiete sind dazugekommen: So wird auch an der Biogenese und Regulation des Chloroplasten (Herrin & Nickelsen 2004; Eberhard et al. 2008), der Struktur und der Funktionsweise des Pyrenoids (Mikrokompartiment, in dem der CO₂-Anreicherungsmechanismus stattfindet) (Wang et al. 2015; Mackinder et al. 2017), an der Lichtwahrnehmung und -adaptation (Petroustos et al. 2016; Alloreant & Petroustos 2017), den Mechanismen des Stickstoff-, Phosphat- und Sulfatstoffwechsels (Wykoff et al. 1999; Zhang et al. 2004; Miller et al. 2010), der Carotinoid-Biosynthese (Lohr et al. 2005), der zirkadianen Rhythmik (Mittag & Wagner 2003; Matsuo & Ishiura 2011), am Zellzyklus (Cross & Umen 2015), am

Fettsäurestoffwechsel, an der biotechnologischen Anwendung für Biokraftstoffe (Merchant *et al.* 2012; Scranton *et al.* 2015) und der Evolution vom Einzeller zu mehrzelligen Volvocineen (Hallmann 2011) geforscht.

Eine lesenswerte Übersicht aktueller Forschungsschwerpunkte der Modellalge *C. reinhardtii* findet sich bei Salomé und Merchant (2019).

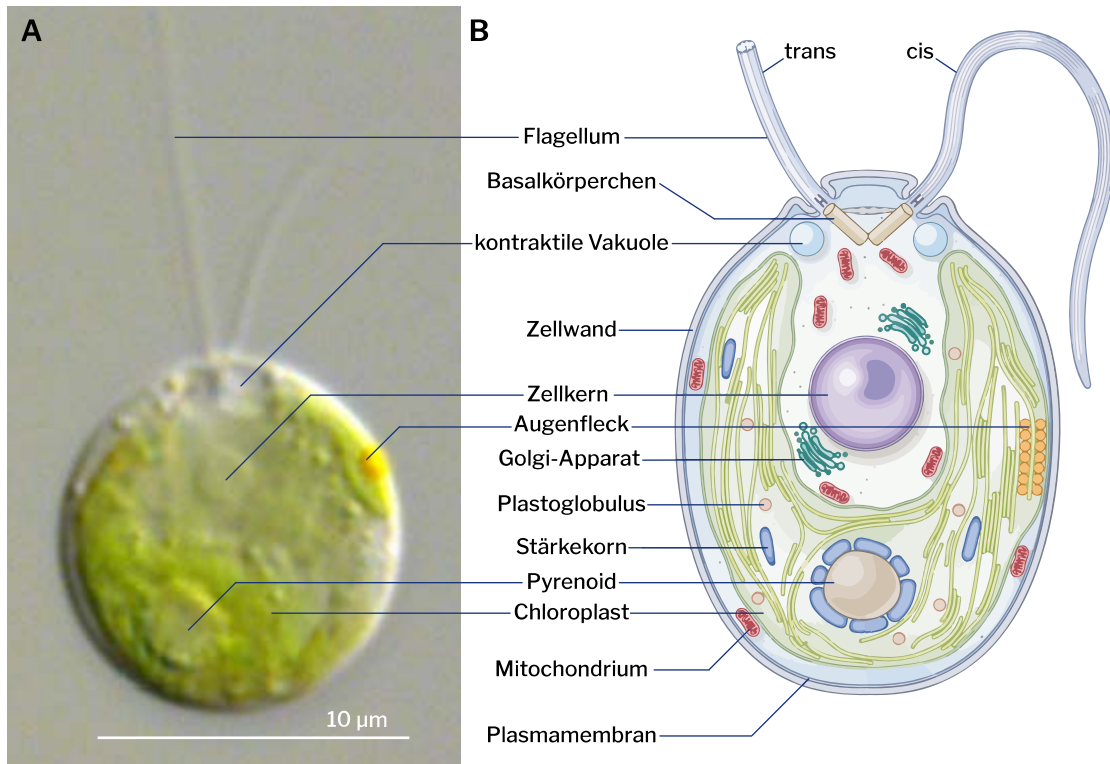


Abbildung 1.2: Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

A) Lichtmikroskopische Aufnahme einer *C. reinhardtii*-Zelle (CC-3403-Stamm) mit Differentialinterferenzkontrast (Nomarski-Kontrast). Flagellen (cis + trans), kontraktile Vakuole, Zellkern, Augenfleck und becherförmiger Chloroplast mit Pyrenoid sind deutlich erkennbar. Der Zelldurchmesser beträgt 10 µm. (Mikroskopiebild wurde von Georg Kreimer aufgenommen und ist in Greiner *et al.* (2017) veröffentlicht. Das Bildmaterial unterliegt dem Copyright der *American Society of Plant Biologists*. **B)** Schematische Darstellung einer *C. reinhardtii*-Zelle (Abbildung von Debbie Maizels aus Sasso *et al.* 2018; Das Bildmaterial unterliegt der Creative Commons Lizenz CC BY 4.0).

1.1.3 Übersicht über die Photorezeptoren

Mit der Verbreitung sequenzierter genomischer Daten von *C. reinhardtii*, zuerst durch cDNA-Datenbanken (Infante *et al.* 1995; Asamizu 1999) und später durch die komplette Genomsequenzierung (Merchant *et al.* 2007), zeigte sich, dass das Genom der Grünalge *C. reinhardtii* eine erstaunliche Fülle an potenziellen Photorezeptorgenen birgt (Abbildung 1.3).

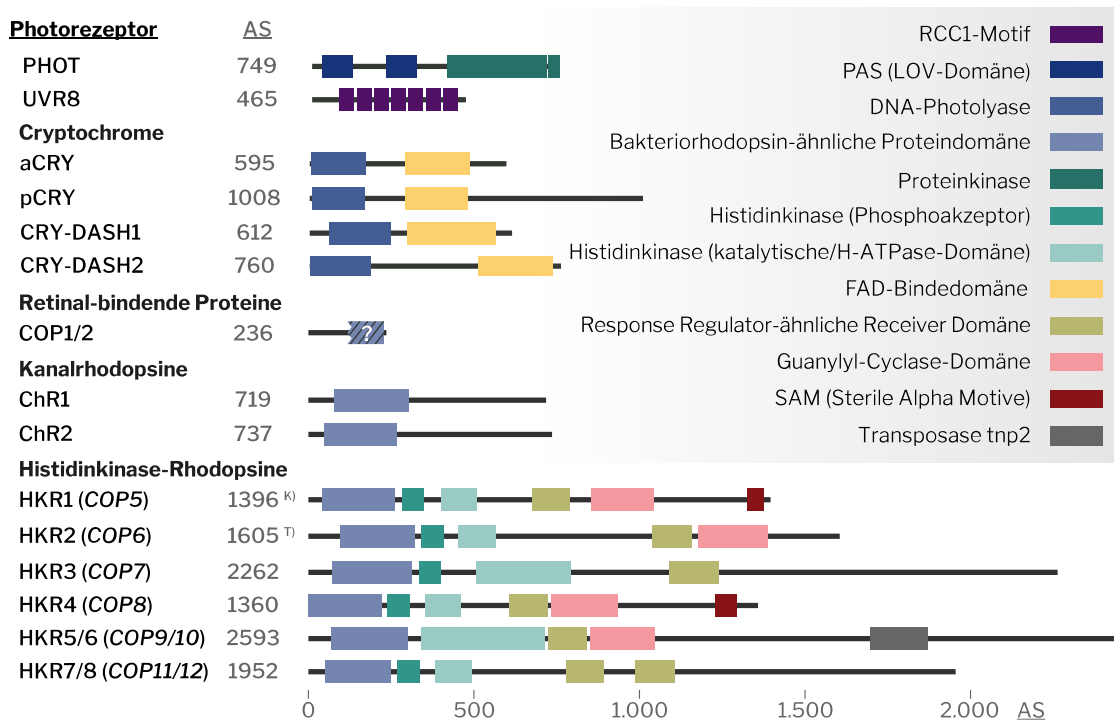


Abbildung 1.3 Übersicht und Architektur der vorhergesagten Photorezeptorgene in *C. reinhardtii*
 Genannotierungen wurden der *Phytozome*-Datenbank (*Phytozome* v. 12; *Creinhardtii* v. 5.6) entnommen und die Domänenarchitektur wurde mit *InterPro*¹ vorhergesagt. Die zugehörigen Gen-IDs sind in Tabelle 29 aufgeführt. AS = Aminosäuren. ^{K)} Genmodel nach Kateriya (2004), ^{T)} Genmodel nach Tian (2018).

Zwölf Gene enthalten eine Rhodopsin-Domäne. Neben den mittlerweile bekannten lichtgesteuerten Ionenkanälen Kanalrhodopsin-1 (ChR1) und Kanalrhodopsin-2 (ChR2) finden sich sechs Vertreter der Klasse der Histidin-Kinase-Rhodopsine (HKRs), deren physiologische Bedeutung noch in keinem Organismus beschrieben werden konnte. Daneben finden sich die aus dem Pflanzenreich bekannten homologen Gene, die für *Phototropin* (*PHOT*), den UV-Rezeptor *UVR8* und die Cryptochrome *aCRY*, *pCRY*, *CRY-DASH1* und *CRY-DASH2* codieren. Für einen Großteil dieser Photorezeptoren wurde die physiologische Rolle noch nicht erforscht. Im Folgenden wird ein Überblick über die bisher gesammelten Erkenntnisse gegeben.

¹ <https://www.ebi.ac.uk/interpro/> (aufgerufen am 26.01.2019)

I) Die Suche nach dem Photorezeptor der Phototaxis

Durch die Fähigkeit von *C. reinhardtii* zur Phototaxis ergab sich das Interesse, die molekulare Funktionsweise der Lichtwahrnehmung zu untersuchen und den bzw. die dafür verantwortlichen Photorezeptor(en) zu identifizieren. Die Alge *C. reinhardtii* ist durch ihre beiden Flagellen in der Lage, sich mit einer dem Brustschwimmen ähnlichen Bewegung nach vorne zu bewegen. Die durchschnittliche Geschwindigkeit beträgt dabei 200 $\mu\text{m/s}$, die maximale Geschwindigkeit während des Flagellenschlags bis zu 1000 $\mu\text{m/s}$ bei einer Rate von 45-70 Hz (Rüffer & Nultsch 1985; Fujita *et al.* 2014). Wie eingangs erwähnt, wurde schon vor über 150 Jahren beobachtet, dass sich Algen im Licht orientieren und dabei bei niedrigen Lichtintensitäten positive und bei hohen Lichtintensitäten negative Phototaxis zeigen (Famintzin 1866). Folglich stellte sich die Frage, wie diese Lichtwahrnehmung auf molekularer Ebene stattfindet und durch welche Photorezeptoren der Lichtreiz aufgenommen wird. Kenneth Foster und Kollegen konnten zeigen, dass in Mutanten, die einen Defekt in der Chlorophyll-Biosynthese aufwiesen, die Phototaxis durch Zugabe von Retinal wiederhergestellt werden konnte. Daraus schlossen sie, dass es sich bei dem Photorezeptor um ein Rhodopsin handeln könnte, da Rhodopsine Retinal als Kofaktor benötigen (Foster & Smyth 1980; Foster *et al.* 1984). Mit elektrophysiologischen Patch-Clamp-Messungen an einzelnen Algenzellen konnten nach Applikation von Lichtpulsen Photoströme gemessen werden (Harz & Hegemann 1991). Damit wurde zum einen gezeigt, dass größtenteils Ca^{2+} -Ionen als Signalträger zwischen Augenfleck und Flagelle verantwortlich sind und zum anderen, dass der Photostrom ohne Verzögerung, also bereits nach $< 500 \mu\text{s}$ nach Belichtung, auftritt. Aufgrund der schnellen Kinetik wurde angenommen, dass der Photorezeptor direkt mit einem Calciumtransporter gekoppelt oder dass das Rhodopsin auch der Calciumtransporter ist (Harz *et al.* 1992; Holland *et al.* 1996).

II) Chlamyopsin 1/2

Aufgrund der oben genannten Retinalrekonstitutionsexperimente an *C. reinhardtii* wurde nach retinalbindenden Proteinen gesucht, infolgedessen das stark exprimierte Protein Chlamyopsin (COP) identifiziert wurde (Beckmann & Hegemann 1991; Deininger *et al.* 1995). Nach Identifikation dessen Genlocus wurden zwei Spleißformen, *COP1* und *COP2*, beobachtet. Auf Basis der AS-Sequenz wurden vier Transmembrandomänen vorhergesagt, die schwache Sequenzhomologien zu Invertebratenopsinen zeigen (Kateriya 2004). Obwohl die translatierten Proteine im Augenfleck lokalisiert wurden (Fuhrmann *et al.* 1999; Schmidt *et al.* 2006), zeigte sich nach Inaktivierung des Gens durch RNA-Interferenz (RNAi) kein Einfluss auf die Phototaxis (Fuhrmann *et al.* 2001). Später wurde eine Lokalisation im Chloroplasten und eine Interaktion mit dem Photosystem I assoziierten Faktor Ycf4 (*hypothetical chloroplast open reading frame 4*) postuliert, die sich aber nicht bestätigte (Ozawa *et al.* 2009; Nellaepalli *et al.* 2018). Somit bleibt die Funktion von COP1/2 nach wie vor unbekannt. Betrachtet man das Transkriptionsprofil der *cop1/2*-mRNA in einem 24-stündigen Tag-Nacht-Zyklus, verläuft die Transkription fast gegensätzlich zum typischen

Augenfleck-Gen *EYE2* und ähnelt mehr den Photosynthesegenen. Nach dem Wechsel in die Lichtphase erreicht die *cop1/2*-Transkriptmenge bei ca. 4 h ihr Maximum (Abbildung 1.4). Ob COP1/2 eine Rolle in der Photosynthese spielen und inwieweit das mit der Lokalisation im Augenfleck zusammenhängt, bleibt vorerst ungeklärt.

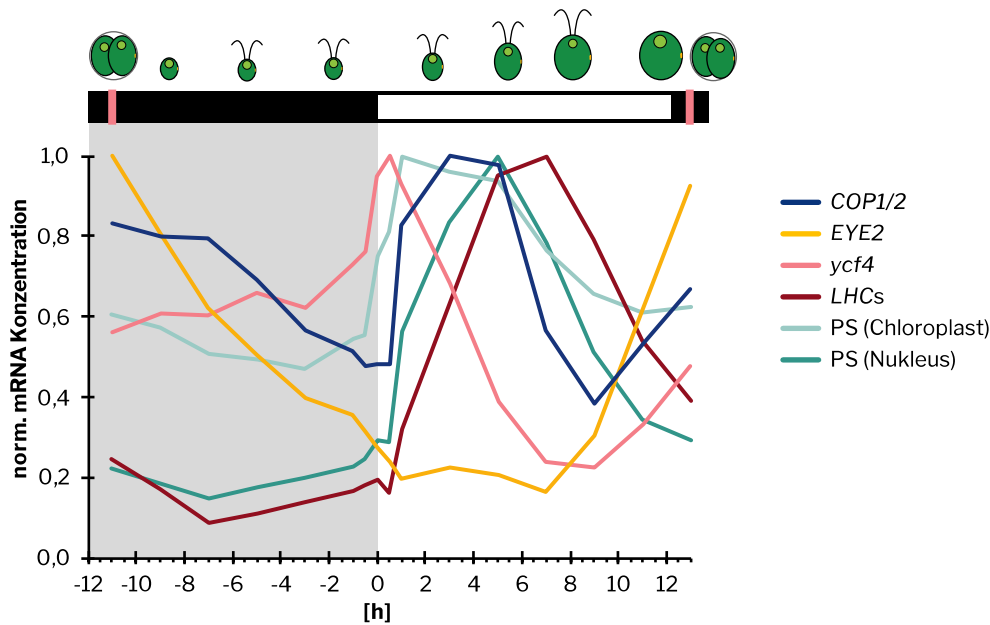


Abbildung 1.4: Expression von COP1/2 im 24-Stunden Nacht-Tag-Rhythmus

Die Expressionsdaten der gezeigten Transkripte sind von Strenkert *et al.* (2019) entnommen und auf ihren Maximalwert normiert dargestellt. Transkriptmengen wurden über 24-Stunden eines Tag-Nacht-Zyklus bestimmt. Schematische Darstellung der Zellteilung, die sich dem Licht-Dunkel-Rhythmus angepasst hat (Strenkert *et al.* 2019). *COP1/2*: *Chlamyopsis 1/2*, *EYE2*: repräsentativ für Gene des Augenflecks, *ycf4*: *hypothetical chloroplast open reading frame 4*, *LHCs*: Durchschnitt der Gene des *Light Harvesting Complexes*, *PS*: Durchschnitt aus nuklear bzw. plastidär codierten Genen, die den Photosynthesekomplexen zugeordnet werden.

III) Die Kanalrhodopsine ChR1 und ChR2

Parallele Arbeiten zweier Arbeitsgruppen konnten schließlich ChR1 und ChR2 als die Photorezeptoren der Phototaxis identifizieren. Sineshchekov und Kollegen zeigten durch RNA-Interferenz (RNAi) Experimente, dass nach Reduktion der *chr1*- und *chr2*-Transkriptmengen die Phototaxis gestört ist (Sineshchekov *et al.* 2002). Nagel und Kollegen exprimierten die Transmembrandomänen von ChR1 und ChR2 in *Xenopus laevis* Eizellen und konnten mit elektrophysiologischen Messungen lichtinduzierte Ionenströme messen (Nagel *et al.* 2002, 2003). Dies bewies, dass die heptahelikalen Rhodopsindomänen von ChR1 und ChR2 tatsächlich sowohl Photorezeptoren als auch Ionenkanäle darstellen. Damit waren lichtgesteuerte (passive) Ionenkanäle entdeckt worden, die seitdem als Kanalrhodopsine bekannt sind. Diese neue Klasse von Proteinen stieß besonders unter den Neurowissenschaftlern auf großes Interesse. Die Expression von Kanalrhodopsin-2 in Nervenzellen erlaubte es erstmalig, Aktionspotenziale durch Stimulation mit Licht zu

induzieren (Boyden *et al.* 2005). Dies ermöglichte nicht nur die Anregung einzelner Zellen, sondern ganzer Gewebe und Gehirnareale. Methoden und Werkzeuge, die es erlauben, lichtinduziert Signale und Prozesse in Zellen auszulösen, werden mittlerweile unter dem Forschungsfeld der Optogenetik zusammengefasst (Deisseroth *et al.* 2006; Deisseroth & Hegemann 2017).

Bei den Kanalrhodopsinen handelt es sich um mikrobielle oder Typ 1-Rhodopsine, die durch ihre Struktur aus sieben transmembranen α -Helices und der Bindung des Chromophors all-*trans*-Retinal an ein konserviertes Lysin in Helix 7 charakterisiert sind (Ernst *et al.* 2014). Das Retinal ist in der Lage, durch Absorption eines Photons Protonentranslokationen innerhalb der ChRs zu induzieren, was eine zyklische Kaskade an Strukturänderungen zur Folge hat und die temporäre Öffnung des Ionenkanals bewirkt. Dabei werden hauptsächlich Protonen, aber im geringeren Maße auch mono- und divalente Kationen, über die Zellmembran geleitet (Tsunoda & Hegemann 2009; Schneider *et al.* 2015). Das Ausmaß der lichtinduzierten Photoströme der ChRs ist abhängig von der eingestrahnten Wellenlänge und dem pH-Wert. Das Aktionspektrum von ChR1 ist pH-Wert-abhängig und verschiebt sein Maximum von 505 nm bei pH 4,5 nach 463 nm bei pH 8,0 (Berthold *et al.* 2008). ChR2 hat sein Aktionsmaximum bei 475 nm und zeigt keine pH-Abhängigkeit (Tsunoda & Hegemann 2009).

Die Kanalrhodopsine sind nach Inkubation der Alge in Dunkelheit vorwiegend in der Region des Augenflecks lokalisiert, wobei sie sich nicht in den chloroplastidären Karotinoid-vesikeln, sondern in der angrenzenden Plasmamembran außerhalb des Chloroplasten befinden (Suzuki *et al.* 2003; Schmidt *et al.* 2006; Berthold *et al.* 2008). Nach Belichtung sind beide Kanalrhodopsine an den Basalkörpern und ChR1 auch zusätzlich entlang der Flagellen lokalisiert (Mittelmeier *et al.* 2011; Awasthi *et al.* 2016). Ob die Kanalrhodopsine dort eine Funktion besitzen, ob es sich dabei um einen Prozessierungs- oder Regenerationsschritt handelt oder ein Mittel zur Lichtadaptation ist, bleibt noch ungeklärt. Zumindest formiert sich der Augenfleck immer auf Höhe des acetylierten Tochter-Mikrotubulus D4, der mit den Basalkörpern in Verbindung steht (Mittelmeier *et al.* 2011; Thompson 2016). Durch Kryoelektronentomographie an 200 nm dicken Schnitten konnten außerdem weitere Vesikel außerhalb der Plasmamembran unter der Zellwand sichtbar gemacht werden, die nur auf Höhe des Augenflecks auftreten (Engel *et al.* 2015). Ob es sich dabei sogar um die Vesikel der Kanalrhodopsine handelt, bleibt herauszufinden. Die Depolarisation der Zelle durch die lichtinduzierte Kanalöffnung setzt eine Signalkaskade zu den Flagellen in Gang – wahrscheinlich über Ca^{2+} (Holland *et al.* 1997; Berthold *et al.* 2008). Starke Lichtsignale führen dabei zu einer kurzzeitigen photophobischen Rückwärtsbewegung der Zellen, während schwache Lichtsignale zu einer gerichteten negativen oder positiven phototaktischen Bewegung führen. Die richtungsbestimmenden Determinanten konnten noch nicht ermittelt werden, entscheidend könnte aber der Phosphorylierungsstatus der Kanalrhodopsine (Böhm *et al.* 2019) oder der Flagellenproteine sein. Die Richtungsänderung bei positiver Phototaxis erfolgt dabei über eine asymmetrische Anpassung der *cis*- und *trans*-

Flagellenfrequenz, die sich der helikalen Drehbewegung anpasst: Die der Lichtquelle abgewandte Flagelle schlägt immer schneller als die der Lichtquelle zugewandte Flagelle, wodurch sich die Richtungsänderung hin zur Lichtquelle ergibt (Leptos *et al.* 2018).

Obwohl die mechanistischen Grundlagen der Kanalrhodopsine gut untersucht sind, bleiben einige physiologische Fragen, wie die Signalverarbeitung zwischen den ChRs und den Flagellen abläuft oder ob sich die Funktionen von ChR1 und ChR2 unterscheiden oder komplementieren, ungeklärt.

IV) Histidin-Kinase-Rhodopsine

Wie oben erwähnt, stellt die Klasse der HKRs eine noch wenig untersuchte Klasse von Rhodopsinen dar. Bisher konnten Vertreter nur im Taxa der Chlorophyten identifiziert werden, dort aber – wie in *C. reinhardtii* – oft mit mehreren Vertretern. HKRs sind Enzymrhodopsine, in denen die Rhodopsin-Domäne mit (sehr) langen C-terminalen Resten gekoppelt ist. Diese enthalten die Histidin-Phosphotransfer-Domänen und teilweise zusätzliche Cyclase-Domänen (Abbildung 1.3). Die Rhodopsindomäne von HKR1 (*COP5*) wurde ausführlich *in vitro* charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass es sich hierbei um ein schaltbares Rhodopsin handelt, es also zwei thermisch stabile Zustände gibt, die sich durch Anregung mit UV- und Blaulicht ineinander überführen lassen (Luck *et al.* 2012; Luck & Hegemann 2017; Luck 2018). Durch Expression von HKR2 (*COP6*, hier als *2c-Cyclop1* bezeichnet) in *X. laevis*-Eizellen konnte gezeigt werden, dass es sich um eine grünlichtinhibierte Guanylatcyclase handelt (Tian *et al.* 2018). HKR4 (*COP8*) wurde nach Inkubation der Zellen im Licht in den Flagellen lokalisiert, wanderte aber während der Dunkelphase in den Augenfleck (Awasthi *et al.* 2016). Eine physiologische Funktion konnte bislang keinem der drei Proteine zugeordnet werden. Erste Indizien lieferten jedoch die Expressionsprofile der HKRs im Tagesverlauf (Abbildung 1.5, Strenkert *et al.* 2019). Es können zwei grobe Expressionsmuster beobachtet werden: HKR1, HKR4 und HKR7/8 (*COP5*, *COP8*, *COP11/12*) sind gleichermaßen in der Licht- wie in der Dunkelphase exprimiert. Beim Wechsel in die Lichtphase zeigt HKR1 keine Veränderung, HKR4 eine kurzzeitige Reduktion und HKR11/12 eine kurzzeitige Erhöhung der Transkriptmenge (Abbildung 1.5). Die andere Gruppe, zu der HKR2, HKR3 und HKR5/6 (*COP6*, *COP7*, *COP9/10*) zählen, ist ausschließlich in der Dunkelphase exprimiert und durch eine scharfe Abnahme ab Eintritt in die Lichtphase charakterisiert (Abbildung 1.5).

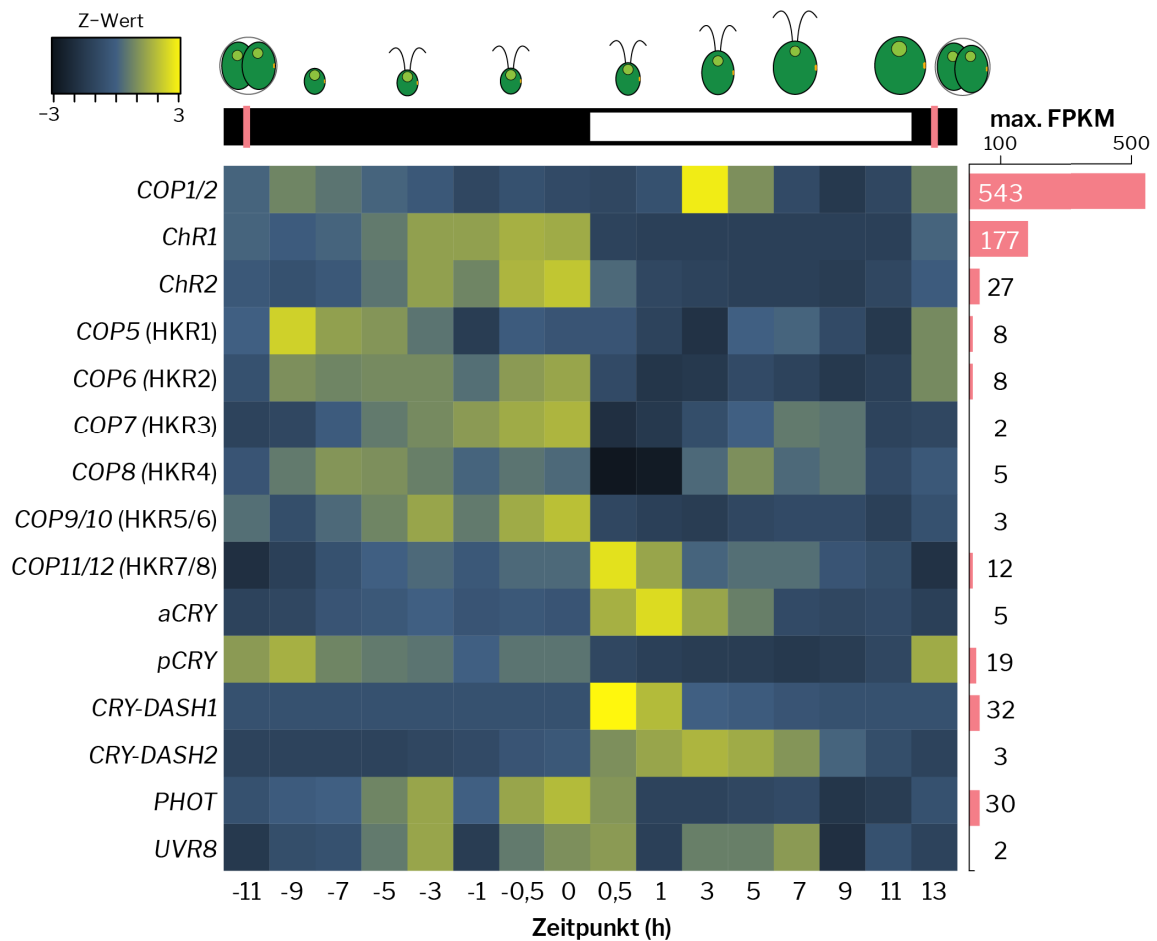


Abbildung 1.5: Expressionsprofil der Photorezeptoren in *C. reinhardtii*

Transkriptmengen im 24-Stunden Tagesverlauf einer synchronisierten Zellpopulation. Gelb = hohe Expression. Dunkelblau = niedrige Expression. Plot wurde erstellt mit *Heatmapper*². Werte sind für jedes Gen normiert (Z-Wert-Standardisierung). FPKM = kb Transkripte pro Millionen Sequenzierzuordnungen (*fragments per kilobase of transcript per million mapped reads*). Daten wurden aus Strenkert *et al.* (2019) entnommen.

V) Phototropin und UVR8

Interessant war die Entdeckung des *Phototropin*-Gens (*PHOT*) im Algen-Genom (Huang *et al.* 2002, 2004; Kasahara *et al.* 2002; Fedorov *et al.* 2003; Huang & Beck 2003). Phototropin besitzt zwei photosensorische LOV-Domänen (*light-oxygen-voltage*), die unter Licht eine Konformationsänderung erfahren und damit die Autophosphorylierung aktivieren. Entdeckt und namensgebend wurde das Phototropin in höheren Pflanzen, als festgestellt wurde, dass es mitverantwortlich für die Bewegung der Pflanze zum Licht ist (Phototropismus) (Christie 1998). Genauere Studien fanden heraus, dass es zwei homologe Isoformen von Phototropin gibt, *Phot1* und *Phot2*, die die Chloroplastenbewegung (Jarillo *et al.* 2001; Kagawa 2001; Sakai *et al.* 2001), die Öffnung der Stomata (Kinoshita *et al.* 2001), die Blattwölbung (de Carbonnel *et al.* 2010) und die Photomorphogenese steuern (Kozuka *et al.* 2011).

² <http://www.heatmapper.ca/> (aufgerufen am 26.01.2020)

Phot2 reguliert hier jeweils die Starklicht-Adaptationen wie beispielsweise die Lichtvermeidungsbewegungen der Chloroplasten.

Auch in *Chlamydomonas* ist Phototropin in mehrere lichtgesteuerte Prozesse involviert. Phototropin ist in den Flagellen lokalisiert und steuert die blaulichtabhängige Differenzierung zu Gameten (Huang *et al.* 2002; Huang & Beck 2003). Außerdem reguliert Phototropin die lichtabhängige Reduktion von ChR1 und die Verkleinerung des Augenflecks unter Starklicht (Trippens *et al.* 2012). Schließlich übernimmt Phototropin eine wichtige Rolle beim Schutz der Photosysteme durch die nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung (*non-photochemical quenching*), indem es die Expression der Lichtsammelkomplexe reguliert (Allorent & Petroustos 2017; Petroustos *et al.* 2016). Dennoch ist ein $\Delta phot$ Knockout-Stamm nicht letal und kann gekreuzt werden (Zorin *et al.* 2009; Greiner *et al.* 2017).

VI) Cryptochrome

Die Cryptochrome bestehen aus konservierten Photolyase-Domänen und der Flavin-Adenin-Dinukleotid(FAD)-Bindedomäne. In Pflanzen sind die Cryptochrome für die blaulichtabhängige Inhibition des Streckenwachstums in Keimlingen verantwortlich und beeinflussen viele weitere lichtabhängige Reaktionen wie die Blüteninduktion, die zirkadiane Uhr oder die Öffnung der Stomata (Liu *et al.* 2011; Hubbard & Dodd 2016). In *C. reinhardtii* sind zwei der vier bekannten Cryptochrome untersucht.

Das *animal-like* Cryptochrom aCRY und das pflanzenähnliche Cryptochrom pCRY sind an den lichtregulierten Schritten des vegetativen und sexuellen Zellzyklus beteiligt. Für aCRY konnten neben seiner Funktion als Photolyase auch sensorische Funktionen gezeigt werden (Franz *et al.* 2018). Außergewöhnlich ist, dass für aCRY neben dem Dunkelzustand mit oxidiertem Flavin zwei lichtaktivierte Zustände beobachtet werden konnten. Unter Anregung mit Blaulicht bildet sich erst ein langwellig absorbierender neutraler Radikalzustand aus, der durch weitere Anregung mit Rotlicht in einen reduzierten Flavinzustand übergeht (Spexard *et al.* 2014; Oldemeyer *et al.* 2016, 2019). Das ist insofern interessant, da aCRY somit der bisher einzige (bekannte) rotlichtabsorbierende Photorezeptor in *C. reinhardtii* ist. Eine Inaktivierung von aCRY oder pCRY führt zu einer reduzierten Differenzierungsrate von Zygoten in vegetativen Zellen, aber zu einer erhöhten Paarungseffizienz von dunkeladaptierten Gameten (Müller *et al.* 2017; Zou *et al.* 2017). Auch der zirkadiane Rhythmus wird durch die Cryptochrome beeinflusst. In einem $\Delta acry$ -Stamm zeigen einige Rhythmikgene wie z. B. *ROC15* ein verändertes Transkriptionsprofil (Beel *et al.* 2012), während ein $\Delta pcry$ -Stamm auf eine Störung des Lichtregimes mit einer veränderten Phasenverschiebung reagiert (Müller *et al.* 2017).

Trotz dieser umfangreichen Untersuchungen bleibt die grundsätzliche Frage ungeklärt, wie die Vielzahl an Photorezeptoren zusammenwirkt und die physiologischen Prozesse in *C. reinhardtii* steuert. Dazu bedarf es jedoch Methoden zur gezielten Genomveränderung, die bisher in Grünalgen nicht etabliert sind.

1.2 Programmierbare Nukleasen als Werkzeug für Genmanipulationen

Erste Hinweise über die Funktion eines bisher unbekanntes Proteins kann die Inaktivierung des dafür codierenden Gens liefern. Aufgrund des Phänotyps der Mutante können Rückschlüsse auf die Genfunktion getroffen werden (Reverse Genetik). Sobald also Methoden zur Gensequenzierung etabliert wurden, wuchs das Interesse an Technologien, die die gezielte Inaktivierung von Genen erlauben. Zwar wurde schon in den frühen genetischen Studien über das Phänomen des *Crossing overs* spekuliert (Morgan et al. 1915), aber der verantwortliche Mechanismus der homologen Rekombination (HR) wurde erst später identifiziert (Lederberg & Tatum 1946; Holliday 1964). Die homologe Rekombination dient der Reparatur und dem Austausch homologer Genabschnitte zwischen zwei Schwesterchromatiden und homologen Chromosomen in polyploiden Zellen. Mithilfe einer Donor-DNA, also einem künstlich hergestellten DNA-Molekül, das homologe Sequenzen zum Zielgen enthält, kann dieses DNA-Reparatursystem gezielt genutzt werden, um Gene zu verändern oder durch den Austausch mit einem Selektionsmarker zu inaktivieren (Scherer & Davis 1979). Die Schwierigkeit besteht darin, Zellen, die die Donor-DNA gezielt durch HR – und damit auch die Genveränderung – eingebaut haben, von den restlichen Zellen zu unterscheiden, die die Donor-DNA durch die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) zufällig an anderen Stellen ins Genom integriert haben. Gerade in menschlichen und pflanzlichen Zellen findet der Einbau durch den NHEJ-Mechanismus um den Faktor 10-1000 häufiger statt (Thomas & Capecchi 1987). Der gezielte Einbau durch HR kann erheblich verbessert werden, wenn am Zielgen ein Doppelstrangbruch (DSB) induziert wird (Rudin & Haber 1988). Dies setzt voraus, dass es eine Nuklease gibt, die spezifisch im Zielgen einen DSB auslöst. So begann die Suche nach Nukleasen, die auf neue Zielsequenzen programmiert werden können. Bei diesen Experimenten wurde bald beobachtet, dass im Zielgen nicht nur die Donor-DNA integriert wurde, sondern dass es in einigen Fällen auch zu kleinen Mutationen (Deletion, Insertion) einiger Basen an der Schnittstelle kam. Solche Verschiebungen des Leserahmens führen meist zu einem nicht funktionellen Protein. Für Gen-Inaktivierungen konnte also auch nur die programmierbare Nuklease ohne Donor-DNA eingesetzt werden (Abbildung 1.6).

1.2.1 Die Entwicklung programmierbarer Nukleasen

Die erste Generation programmierbarer Nukleasen waren Homing- bzw. Meganukleasen mit langen (14-40 bp) Erkennungssequenzen (Wang *et al.* 1995; Cole-Strauss *et al.* 1996). Interessanterweise wurde ein Vertreter (*I-CreI*) im Chloroplasten-Genom von *C. reinhardtii* identifiziert (Rochaix & Malnoe 1978). Allerdings war eine Veränderung der Erkennungssequenz durch zufällige Mutationen aufwendig und nicht immer möglich und so blieb die Auswahl an möglichen Zielsequenzen sehr eingeschränkt.

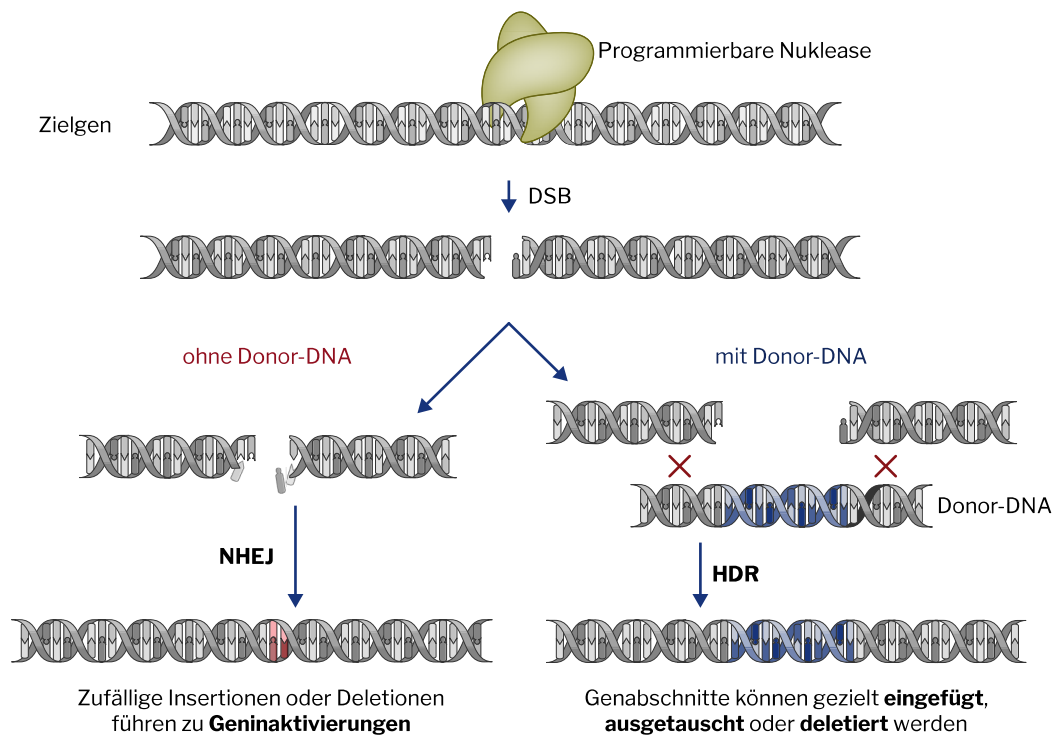


Abbildung 1.6: Programmierbare Nukleasen als Methode zur Genveränderung.

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) werden durch die zelleigenen DNA-Reparatursysteme geschlossen. Die Reparatur durch die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) kann zum Verlust oder der Insertion zufälliger Basen führen. Bei Verschiebungen des Leserahmens kommt es zu Geninaktivierungen. Homologe Sequenzen der Donor-DNA werden durch Homologie-vermittelte Reparatursysteme (HDR) erkannt und als Vorlage verwendet. Somit können gezielte Genveränderungen wie präzise Gen-Insertionen, -Austausche und -Deletionen durchgeführt werden.

Die zweite Generation verwendete synthetische Fusionsproteine zwischen einer unspezifischen Nuklease-Domäne (meist *FokI*) und einer DNA-Bindedomäne (Kim & Chandrasegaran 1994; Kim *et al.* 1996). Die ersten Transkriptionsfaktoren, deren „Code“ entschlüsselt werden konnte, waren Zinkfinger- (ZF)-Proteine. Die Bindung folgte einem modularen Muster, bei dem jeder „Finger“ mit drei DNA-Basenpaaren interagiert (Pavletich & Pabo 1991, 1993). Durch Aneinanderreihung von drei bis sechs Zinkfingern konnten Sequenzen von 9-18 bp gebunden werden. Zinkfinger-Nukleasen erlaubten durch ihren modularen Aufbau ein breites Anwendungsgebiet und wurden in den meisten Modellorganismen für Genmanipulationen angewendet (Carroll 2016). Mit der Entschlüsselung der Transkriptionsaktivator-ähnlichen-Effektor(TALE)-Proteine gewannen programmierbare Nukleasen weiter an Popularität (Boch *et al.* 2009; Moscou & Bogdanove 2009). Da hier ein Modul nur eine Base bindet, konnte die Zielsequenz noch flexibler gestaltet werden, so dass fast jede beliebige DNA-Sequenz als Zielsequenz ausgewählt werden konnte.

1.2.2 Das CRISPR-Abwehrsystem

Die heute am weitesten verbreitete programmierbare Nuklease ist CRISPR/Cas9. Die als *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) zusammengefassten Gencluster sind in Bakterien und Archaeen verbreitete adaptive Abwehrsysteme gegen eindringende Virus- und Plasmid-DNA bzw. RNA. Die namensgebenden CRISPR-RNA(crRNA)-Genabschnitte sind modular aufgebaut, wodurch sich konstante palindromische Sequenzabschnitte (*Repeats*) mit Zielsequenz-spezifischen Abschnitten (*Spacers*) abwechseln. In genomischer Nähe zu den CRISPR-Arrays befinden sich die CRISPR-assoziierten (*cas*)-Gene, die für die Cas-Effektoren codieren. Die CRISPR-Immunität besteht aus drei Phasen (Abbildung 1.7): Während der Adaptionsphase (1) werden virale oder Plasmid-DNA-Fragmente (*Protospacer*) mithilfe der Cas1- und Cas2-Effektoren am Ende eines CRISPR-Arrays in das Genom integriert. In der Expressionsphase (2) werden die pre-crRNAs transkribiert und zu reifen crRNAs prozessiert. In der Interferenzphase (3) bilden die crRNAs mit den Cas-Nukleasen (z. B. Cas9) einen Ribonukleoprotein(RNP)-Komplex. Kann die crRNA an eindringende DNA oder RNA binden, wird diese geschnitten und abgebaut.

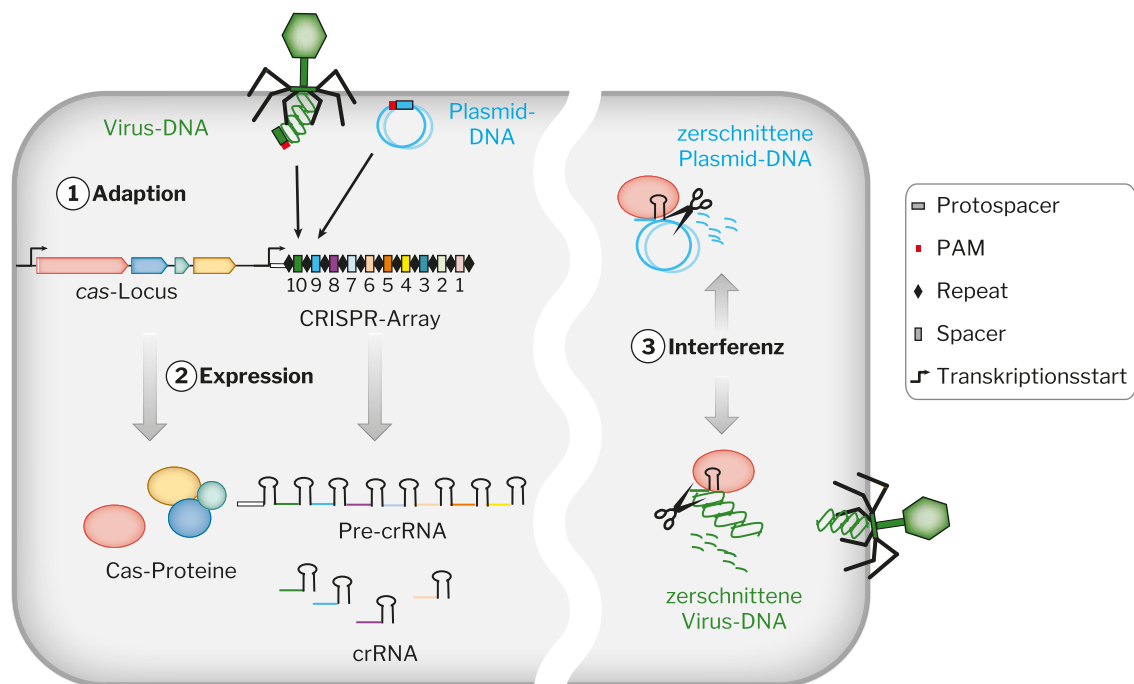


Abbildung 1.7: Funktionsweise der CRISPR/Cas-Abwehrsysteme

Während der Adaptionsphase (1) werden virale Nukleotide oder Plasmid-Fragmente (*Protospacer*) am Ende eines CRISPR-Arrays in das Genom integriert. In der Expressionsphase (2) werden die *cas*-Gene abgelesen und die pre-crRNAs zu reifen crRNAs prozessiert. Cas-Proteine hybridisieren mit den crRNAs. In der Interferenzphase (3) wird die Fremd-DNA oder -RNA geschnitten und abgebaut. Abbildung übersetzt von Bhaya et al. (2011), reproduziert mit Genehmigung von *Annual Reviews, Inc.*

CRISPR/Cas-Systeme sind weit verbreitet und entsprechend divers sind die Nuklease-Mechanismen und Zielsubstrate. Während die Proteine der Adaptionsphase (Cas1 und Cas2) hoch konserviert und bei der Identifikation neuer CRISPR-Genabschnitte hilfreich waren,

findet die Klassifizierung der CRISPR-Systeme anhand der Diversität der Effektorproteine statt. Aktuell sind 47.174 CRISPR-Arrays bekannt, die in zwei Klassen, fünf Typen und 16 Subtypen eingeordnet wurden (Shmakov *et al.* 2017). Während sich die Klasse I CRISPR-Effektoren aus 4-7 Cas-Proteinen zusammensetzen, bestehen die Klasse II-Effektoren aus nur einem Multi-Domänen Cas-Protein. Umso weniger Komponenten ein System hat, desto einfacher ist meist die Handhabung und macht eine erfolgreiche Anwendung wahrscheinlicher. Das ist auch der Grund, weshalb mit der Klasse II, Typ II Nuklease Cas9 der Durchbruch gelang, ein molekulares Werkzeug zu etablieren, mit dem RNA-geleitete DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst werden können. Die Zielsequenz wird durch 20 bp der crRNA definiert (Brouns *et al.* 2008). Das macht das „Programmieren“ der Cas-Nukleasen (so) einfach und ist der Grund für die breite Anwendung und die hohe Popularität im Vergleich zu den ZF- oder TALE-Nukleasen. Neben der Zielsequenz gibt es zu jeder Nuklease noch ein spezifisches Motiv (*Protospacer Adjacent Motif*, PAM), das der Zielsequenz folgen muss (Deveau *et al.* 2008). Dieses Motiv ist der Schutzmechanismus dafür, dass die Nuklease die im CRISPR-Genlocus codierte Zielsequenz nicht im eigenen Genom schneidet. Im Fall von *Streptococcus pyogenes* Cas9 müssen die Basen „NGG“ der Zielsequenz folgen, damit der Cas9/gRNA-Komplex die Zielsequenz erkennt und schneidet (Abbildung 1.8 A).

1.2.3 Die Anwendung von CRISPR/Cas9 als RNA-bindende Designernuklease

Anfang der 2010er Jahren etablierte sich in der CRISPR-Forschung, dass zur Ausbildung eines funktionellen Nuklease-Komplex des Cas9-Systems drei Komponenten essenziell sind: das Cas9-Protein, die crRNA und die tracrRNA (Garneau *et al.* 2010; Deltcheva *et al.* 2011; Sapranaukas *et al.* 2011). Das zunehmende Verständnis über die Funktionsweise der CRISPR/Cas-Nukleasen führte zu steigendem Interesse, das Potenzial einer RNA-geleiteten Nuklease als Werkzeug zur Genmanipulation auszuschöpfen. Vier parallele Studien waren wegberreitend bei der Entwicklung des CRISPR/Cas9-Systems zur Anwendung als programmierbare Nuklease in eukaryotischen Zellsystemen.

Die gemeinhin als „die Entdecker“ von CRISPR/Cas9 bekannten Wissenschaftlerinnen Emmanuelle Charpentier (*Umeå Universität*) und Jennifer A. Doudna (*Berkeley University*) erbrachten den biochemischen Nachweis, dass der Cas9-Komplex als Nuklease verwendet werden kann. In einer Kooperation der beiden Arbeitsgruppen reinigten sie rekombinantes *S. pyogenes* Cas9-Protein auf und transkribierten die crRNA und die tracrRNA. Wurden alle drei Komponenten mit einer DNA inkubiert, die eine passende Zielsequenz enthielt, wurden *in vitro* DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst (Jinek *et al.* 2012). Dies bewies, dass tatsächlich nur das Cas9-Enzym und keine weiteren Cas-Effektoren benötigt werden. Außerdem zeigten Charpentier und Doudna, dass die tracrRNA nicht an der crRNA-Prozessierung beteiligt ist, sondern zusammen mit der crRNA an das Cas9-Protein bindet. Dieses Wissen erlaubte ihnen, die crRNA und tracrRNA mit einer Linkersequenz zu einer *single-guide* RNA (sgRNA) zu verbinden und das 3'-Ende zu kürzen. Damit entwickelten sie ein System, das nur zwei Komponenten benötigt: das Cas9-Protein und eine kurze sgRNA (Jinek *et al.* 2012).

Zur gleichen Zeit kam der seit vielen Jahren an dem CRISPR-System forschende litauische Wissenschaftler Virginijus Siksnys (*Vilnius University*) zu vergleichbaren Ergebnissen. Seine Arbeitsgruppe klonierte den kompletten CRISPR/Cas9-Locus von *Streptococcus thermophilus* in *E. coli* und reinigte den Cas9-Komplex auf. Der aufgereinigte Ribonukleoprotein-Komplex war funktionell und schnitt DNA *in vitro* (Gasiunas *et al.* 2012). Siksnys zeigte zwar, dass der Ribonukleoprotein-Komplex auch die crRNA enthielt, übersah aber die tracrRNA. Dafür zeigte er durch Mutationsstudien der Cas9-Nuklease-Domänen, dass die HNH-Nuklease-Domäne den Zielstrang schneidet und die RuvC-Nuklease-Domäne den komplementären DNA-Strang (Gasiunas *et al.* 2012). Siksnys reichte seine Ergebnisse am 6. April 2012 bei *Cell* ein. Die Publikation wurde postwendend abgelehnt. Am 21. Mai 2012 – noch zwei Wochen bevor Charpentier und Doudna am 8. Juni 2012 ihre Ergebnisse bei *Science* einreichten – unternahm Siksnys den zweiten Anlauf beim *PNAS*, wo seine Arbeit schließlich am 4. September 2012 veröffentlicht wurde. Die Publikation von Charpentier und Doudna wurde schneller bearbeitet und am 28. Juni 2012 veröffentlicht.

Den nächsten Schritt, das CRISPR/Cas9-System als programmierbare Nuklease in eukaryotischen Zellsystemen zu etablieren, unternahmen zwei Labore, die bisher noch nicht mit den CRISPR-Systemen gearbeitet hatten. Feng Zhang, der Anfang 2011 gerade sein eigenes Labor am *Broad Institute* des *Massachusetts Institute of Technology (MIT)* und *Harvard* mit dem Themenschwerpunkt der Genom- und Transkriptom-Manipulation aufbaute, erfuhr zu dieser Zeit von dem CRISPR-Abwehrsystem und ließ seine ersten Doktoranden Le Cong und Ann Ran dieses Thema bearbeiten. Zhang war von vornherein an der Anwendung in menschlichen Zellen interessiert und startete die Experimente direkt an menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK). Seine Arbeitsgruppe etablierte die effiziente Lokalisation des Cas9-Komplexes in den Nukleus und eine funktionsfähige Isoform der tracrRNA. Anhand von 16 Zielsequenzen zeigten sie die effiziente Genmanipulation in humanen und murinen Zellen. Durch Anordnung zweier crRNAs in einem CRISPR-Array konnten zwei Gene parallel inaktiviert werden. Außerdem zeigten sie, dass mit Cas9 oder der Cas9-Nickase die homologe Rekombination stimuliert wird und für präzise Insertionen und Deletionen genutzt werden kann. Auch testeten sie die verkürzte einzelsträngige sgRNA von Jinek *et al.* (2012), allerdings war diese in eukaryotischen Zellen nicht funktionell. Nur mit einer längeren 3'-Haarnadelstruktur wurde ein funktioneller Komplex *in vivo* ausgebildet. Die Ergebnisse wurden am 3. Januar 2013 in *Science* publiziert und wurde die am häufigsten zitierte CRISPR-Veröffentlichung (3,955³ Zitierungen, Cong *et al.* 2013). In der gleichen *Science*-Ausgabe vom 3. Januar 2013 erschienen parallel mit der Arbeit von Le Cong *et al.* (2013) auch die Ergebnisse von George Church (*Harvard University*). Die Arbeitsgruppe von Church zeigte die Anwendung von Cas9 in menschlichen Zellen inklusive induzierten pluripotenten Stammzellen, indem sie Genmodifikationen an zwei Stellen im *AAVS1*-Gen einführten (Mali *et al.* 2013). Kurz darauf, am 29. Januar 2013, veröffentlichten Doudna und

³ https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23287718-multiplex-genome-engineering-using-crisprcas-systems/?from_term=cas9+cong&from_pos=1 (aufgerufen am 26.01.2020)

ihr Team, wie die CRISPR-Nuklease in menschlichen Zellen angewendet werden kann (Jinek *et al.* 2013).

Die Anwendung der neuen Nuklease stieß weltweit auf starkes Interesse und Wissenschaftler begannen die Nuklease für ihre eigenen Experimente anzuwenden. Alleine innerhalb des Jahres 2013 konnte die CRISPR/Cas9-Nuklease für den Großteil der Modellorganismen etabliert werden. So wurde Cas9 in folgenden Phyla zur Genmodifikation angewendet:

- In Bakterien (*Bacteria*): *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* (Jiang *et al.* 2013a);
- In Pilzen (*Fungi*): Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (DiCarlo *et al.* 2013);
- In Häutungstieren (*Ecdysozoa*): Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Chen *et al.* 2013; Dickinson *et al.* 2013; Tzur *et al.* 2013; Waaijers *et al.* 2013), Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Bassett *et al.* 2013; Gratz *et al.* 2013; Kondo & Ueda 2013; Ren *et al.* 2013; Yu *et al.* 2013);
- In Wirbeltieren (*Vertebrata*): Krallenfrosch *Xenopus tropicalis* (Blitz *et al.* 2013; Nakayama *et al.* 2013), Zebrafisch *Danio rerio* (Chang *et al.* 2013; Hwang *et al.* 2013; Xiao *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014);
- In Säugetieren (*Mammalia*): Maus *Mus musculus* (Fujii *et al.* 2013; Mashiko *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013), Ratte *Rattus norvegicus domestica* (Hu *et al.* 2013), Göttinger Minischwein *Sus scrofa domesticus* (Tan *et al.* 2013), humane Zellen (Cho *et al.* 2013; Cong *et al.* 2013; Mali *et al.* 2013);
- In Pflanzen (*Plantae*): Reis *Oryza sativa* (Shan *et al.* 2013; Xie & Yang 2013), Weizen *Triticum aestivum* (Shan *et al.* 2013; Upadhyay *et al.* 2013), Hirse *Sorghum bicolor* (Jiang *et al.* 2013b), Tabak *Nicotiana benthamiana* (Nekrasov *et al.* 2013), Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.* 2013).

Mittlerweile ist CRISPR-basierte Genom-Editierung ein Standardwerkzeug für alle Organismen geworden – in der Wissenschaft sowie für biotechnologische Anwendungen. Während anfangs meist Plasmide oder mRNAs benutzt wurden, um Cas9 zu exprimieren, etablierten sich für viele Organismen auch Protokolle, in denen rekombinant hergestellte Cas9/gRNA-Komplexe direkt in die Wirtszelle transformiert wurden (Chang *et al.* 2013; Cho *et al.* 2013; Kim *et al.* 2015; Liang *et al.* 2017b). Einerseits senkt dies die Risiken für unerwünschte unspezifische DNA-Doppelstrangbrüche, da die Cas9-Nuklease hier nur zeitlich begrenzt in der Zelle vorhanden ist (Kim *et al.* 2014; Lin *et al.* 2014; Zuris *et al.* 2015). Andererseits eröffnet sich damit auch der Einsatz in Zellsystemen, in denen die Expression heterologer DNA ineffizient ist oder entsprechende Regulationssequenzen noch unbekannt sind. Somit können auch Gene in Nicht-Modellorganismen modifiziert werden, sobald Protokolle zur Kultivierung und zur Transformation entwickelt wurden (Faktorová *et al.* 2019). Zusammen mit den gesunkenen Preisen für DNA-Sequenzierung und -Synthese ist es einfacher denn je, bisher nicht im Labor verwendete Organismen molekularbiologisch zu untersuchen und genetisch zu manipulieren.

Mit dem Durchbruch der Cas9-Nuklease begann die Charakterisierung weiterer orthologer und paraloger Cas-Nukleasen, wodurch Varianten mit neuen Eigenschaften wie alternativen PAM-Sequenzen gefunden wurden (Tabelle 1). So wurde beispielsweise die Aktivität der kleineren Cas9-Nukleasen aus *Staphylococcus aureus* (SaCas9: 1053 AS, Ran *et al.* 2015), *Campylobacter jejuni* (CjCas9: 984 AS, Kim *et al.* 2017) und *Neisseria meningitidis* (NmCas9: 1082 AS, Ibraheim *et al.* 2018) im Mausmodell mithilfe von Adeno-assoziierten Viren (AAV) gezeigt. Dies könnte für therapeutische Zwecke relevant sein, da AAVs eine Möglichkeit darstellen, um CRISPR-Nukleasen am Menschen anzuwenden. AAVs sind die einzigen Viren, die bisher für Gentherapien von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) genehmigt wurden. Die maximale Verpackungskapazität der AAVs (4,4-5,2 kb) limitiert allerdings die Größe der DNA-Konstrukte und schließt den Einsatz von SpCas9 aus. Für SaCas9 läuft die erste klinische Studie Phase 1 am Menschen, um die Behandlung einer genetisch verursachten Form der Blindheit (Lebersche Kongenitale Amaurose Typ 10) zu untersuchen (Allergan 2019, NTC-Nr.: NTC03872479). Eine andere Möglichkeit, die Eigenschaften des Cas9-Proteins zu verändern, sind Mutationsstudien und der Austausch einzelner Aminosäuren. Mithilfe der Cas9-Kristallstruktur (Anders *et al.* 2014; Nishimasu *et al.* 2014) wurden durch gerichtete und zufällige Mutationen Cas9-Varianten generiert, die eine erhöhte Spezifität oder alternative PAM-Sequenzen aufwiesen (Kleinstiver *et al.* 2015, 2016; Hu *et al.* 2018; Nishimasu *et al.* 2018).

Neben Cas9 konnten auch die Cas-Nukleasen des Typ V (Cas12a-f; früher Cpf1) in eukaryotischen Zellen etabliert werden (Tabelle 1, Zetsche *et al.* 2015; Harrington *et al.* 2018; Teng *et al.* 2018; Liu *et al.* 2019; Strecker *et al.* 2019). Neben einer A/T-reichen PAM besitzen Cas12-Proteine nur eine RuvC-Nuklease-Domäne, die beide Stränge schneidet und erzeugen DNA-Enden mit 4-5 bp Überhängen (Abbildung 1.8 B). Außerdem besitzen sie eine Domäne, die die Prozessierung der crRNA katalysiert. Das erlaubt die Herstellung mehrerer crRNAs von einem langen Transkript.

Die dritte Familie untersuchter Cas-Nukleasen sind die Cas13(a-d)-Nukleasen der Typ VI CRISPR-Systeme (Tabelle 1, Abudayyeh *et al.* 2016; East-Seletsky *et al.* 2016; Smargon *et al.* 2017). Dabei handelt es sich um RNA-geleitete RNasen (Abbildung 1.8 C). Erkennt der Cas13/crRNA-Komplex eine RNA mit der passenden Zielsequenz, wird nicht nur sequenzspezifisch die Ziel-RNA geschnitten, sondern die Nuklease zeigt auch unspezifische Schnittaktivität und schneidet alle in der Zelle vorhandenen RNAs (Meeske & Marraffini 2018). Dies führte zu einer neuen Anwendung als molekulares Werkzeug, zur kostengünstigen und sensitiven DNA- und RNA-Detektion (Gootenberg *et al.* 2017, 2018). Interessanterweise ist die kollaterale RNase-Aktivität aber nur in Bakterienzellen und *in vitro* zu beobachten, nicht in eukaryotischen Zellen. In eukaryotischen Systemen kann Cas13 zur gezielten Degradation der Ziel-RNA eingesetzt werden (Abudayyeh *et al.* 2017; Konermann *et al.* 2018). Mit Cas13-Effektoren wurde eine neue Plattform etabliert, um präzise Änderungen auch auf Transkriptomebene vorzunehmen.

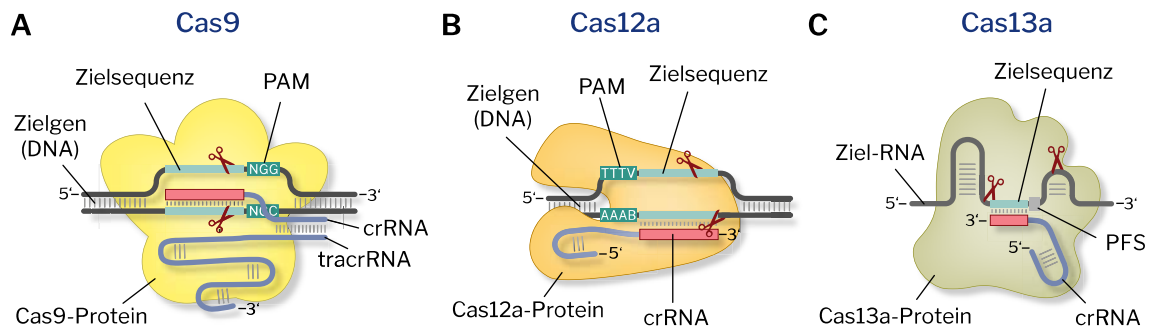


Abbildung 1.8: Funktionsweise der Cas9-, Cas12a- und Cas13a-Nuklease.

A) Die Cas9-Nuklease bilden mit der crRNA und tracrRNA einen RNP-Komplex. Die PAM ist 3'- des Protospacers (z. B. für *S. pyogenes* „NGG“). Cas9 schneidet 3 Basen strangaufwärts der PAM und hinterlässt glatte DNA-Enden (Jinek *et al.* 2013). **B)** Die Cas12a-Nuklease interagiert mit einer einzelsträngigen gRNA. Die PAM (z. B. für *Lachnospiraceae* „TTTV“) befindet sich 5' des Protospacers und hinterlässt 4-5-bp DNA-Überhänge 17-21 Basen strangabwärts der PAM. (Zetsche *et al.* 2015). **C)** Cas13a bindet und schneidet RNA. Die PFS (*protospacer flanking sequence*) ist oft degeneriert. Die Position der Schnittstellen hängt von der Sekundärstruktur ab und ist nicht festgelegt durch die Position der Zielsequenz (Abudayyeh *et al.* 2016).

Die Besonderheit aller Cas-Nukleasen ist, dass die Zielsequenz durch die interagierende crRNA festgelegt wird, was eine einfache „Umprogrammierung“ auf neue Zielsequenzen erlaubt. Durch Mutation der Nukleasedomänen wurden Cas-Proteine erzeugt, deren Nuklease-Aktivität inaktiviert ist, die aber weiterhin im Komplex mit der crRNA an die DNA- bzw. RNA-Zielsequenz binden. Die dadurch erhaltenen RNA-geleiteten DNA- und RNA-Bindedomänen (dCas) bieten eine einzigartige Möglichkeit, zur Entwicklung neuartiger programmierbarer DNA- und RNA-Effektoren.

Durch Fusion des *Krüppel-associated box*(KRAB)-Proteins an dCas9 kann die Transkription eines Zielgens inhibiert werden (Gilbert *et al.* 2013). Aktivierungsdomänen wie VP64 und P65 führen zu einer präzisen Genaktivierung (Konermann *et al.* 2015). Auch gezielte epigenetische Modifikationen wie die Acetylierung (Hilton *et al.* 2015) und Demethylierung (Kearns *et al.* 2015) von Histonen sowie DNA-Methylierung und -Demethylierung (Liu *et al.* 2016) konnten gezeigt werden. Verschiedene Arbeiten zeigten auch die Möglichkeit, Basen gezielt auszutauschen. Mithilfe verschiedener DNA-Desaminasen lassen sich C-G zu T-A und A-T zu G-C Mutationen einführen (zusammengefasst in Rees & Liu 2018).

Auch dCas12 (Zetsche *et al.* 2015) und dCas13 (Abudayyeh *et al.* 2016) können als Grundlage verwendet werden, was besonders im Fall von dCas13 interessant ist, da damit das Anwendungsgebiet auf RNA-Manipulierungen erweitert wurde. Damit lassen sich RNAs lokalisieren (Nelles *et al.* 2016; Abudayyeh *et al.* 2017), das Spleißen einzelner Exons steuern (Konermann *et al.* 2018) oder RNA-Basen gezielt ändern (Cox *et al.* 2017).

Der modulare Aufbau und die Vielfältigkeit der CRISPR/Cas-Systeme revolutionieren die Möglichkeiten, genetische Informationen in lebenden Zellen zu manipulieren. Auch außerhalb des Labors gibt es vielfältige Anwendungen der CRISPR-Technologie: Optimierung von Agrarpflanzen, Früherkennung von Pathogenen und Krankheitsbildern bis hin zu Gentherapien am Menschen (Zhang 2019). Umso wichtiger ist auch die ethische Auseinandersetzung mit diesen Technologien. Führende Wissenschaftler, darunter auch die

CRISPR-Pioniere Charpentier und Zhang, der ehemalige DFG-Präsident Ernst-Ludwig Winnacker und mehrere chinesische Wissenschaftler, forderten kürzlich ein Moratorium für Genmanipulationen der Keimbahn (Lander *et al.* 2019).

Tabelle 1: Für Genmanipulationen in eukaryotischen Zellen angewendete CRISPR/Cas-Effektoren

AS = Aminosäuren, PAM = *protospacer adjacent motif*, PFS = *protospacer flanking site*, N = {A, T, C, G}, W = {A, T}, R = {A, G}, D = {A, G, T}, V = {A, G, C}, H = {A, T, C}, ^M = Metagenomische Sequenzdaten, nv* = keine Präferenz in eukaryotischen Zellen.

Organismus	Name	Länge (AS)	PAM	Referenz
Cas9-Orthologe (Klasse 2, Typ II)				
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>SpCas9</i>	1.368	NGG (3')	<i>Jinek et al. 2012</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>St1Cas9</i>	1.122	N ₂ AGAAW (3')	<i>Cong et al. 2013</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>NmCas9</i>	1.082	N ₄ GAYT (3')	<i>Hou et al. 2013</i>
<i>Treponema denticola</i>	<i>TdCas9</i>	1.423	NAAAAN (3')	<i>Esvelt et al. 2013</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>SaCas9</i>	1.053	N ₂ GRRT (3')	<i>Ran et al. 2015</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>St3Cas9</i>	1.393	NGGNG (3')	<i>Xu et al. 2015b</i>
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>BlatCas9</i>	1.092	N ₄ CNDD (3')	<i>Karvelis et al. 2015</i>
<i>Francisella novicida</i>	<i>FnCas9</i>	1.629	NGG (3')	<i>Hirano et al. 2016</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>CjCas9</i>	984	N ₄ VRYM (3')	<i>Kim et al. 2017</i>
Cas12-Nukleasen (Klasse 2 Typ V)				
<i>Acidaminococcus sp. BV3L6</i>	<i>AsCas12a</i>	1.307	TTTV (5')	<i>Zetsche et al. 2015</i>
<i>Lachnospiraceae bacterium ND2006</i>	<i>LbCas12a</i>	1.228	TTTV (5')	<i>Zetsche et al. 2015</i>
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	<i>AaCas12b</i>	1.129	TTN (5')	<i>Teng et al. 2018</i>
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	<i>AacCas12b</i>	1.129	TTN (5')	<i>Strecker et al. 2019</i>
<i>Bacillus hisashii</i>	<i>BhCas12b</i>	1.108	ATTC (5')	<i>Strecker et al. 2019</i>
<i>Deltaproteobacteria</i> ^M (<i>Cas12X</i>)	<i>DpbCas12e</i>	985	TTCN (5')	<i>Liu et al. 2019</i>
<i>Planctomycetes</i> ^M (<i>Cas12X</i>)	<i>PlmCas12e</i>	977	TTCN (5')	<i>Liu et al. 2019</i>
Cas13-Nukleasen (Klasse 2 Typ VI)				
<i>Leptotrichia shahii</i>	<i>LshCas13a</i>	1.389	H (3')	<i>Abudayyeh et al. 2016</i>
<i>Leptotrichia wadei</i>	<i>LwaCas13a</i>	1.182	nv*	<i>Abudayyeh et al. 2017</i>
<i>Prevotella sp. P5-125</i>	<i>PspCas13b</i>	1.090	nv*	<i>Cox et al. 2017</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>RfxCas13d</i>	966	nv*	<i>Konermann et al. 2018</i>

1.3 Anwendung des CRISPR-Systems in *Chlamydomonas*

1.3.1 Bisheriger Fortschritt in der reversen Genetik in *C. reinhardtii*

In der ersten Veröffentlichung über eine effiziente Methode zur Transformation von *C. reinhardtii*-Zellen wurde bereits spekuliert, dass „with the present efficiency [...] experiments that require high rates of transformation should now be possible. These include gene disruption and gene replacement experiments, which require homologous recombination“ (Kindle 1990). Zu dieser Zeit war die gängige Methode, das Zielgen durch eine Resistenzkassette auszutauschen, die mit homologen Bereichen zum Ziellocus umgeben war (*gene targeting*). Die homologen Bereiche aktivieren die DNA-Reparatur der homologen Rekombination. Tatsächlich wurde drei Jahre später gezeigt, dass eine defekte Version des selektierbaren *NIT1*-Gens mithilfe einer Donor-DNA durch homologe Rekombination (HR) wiederhergestellt werden konnte (Sodeinde & Kindle 1993). Als Nelson & Lefebvre (1995) eine gezielte Geninaktivierung eines nicht selektierbaren Gens anstrebten, mussten sie 4000 Klone analysieren, um acht Modifikationen des *NIT8*-Gens zu identifizieren. Nur eine Mutante wurde durch fehlerfreie homologe Insertion des Donorplasmids verursacht. Es dauerte weitere 10 Jahre, bis der nächste gezielte Gen-Knockout in *C. reinhardtii* gelang (Zorin *et al.* 2005).

Eine Möglichkeit, die Häufigkeit von ortsgerichteten Integrationen zu erhöhen, ist die Verwendung einzelsträngiger Donor-DNA. Zorin und Kollegen gelang damit die gezielte Inaktivierung des *PHOT*-Gens (Zorin *et al.* 2009). Dieses Verfahren beruht jedoch auf der Integration eines Selektionsmarkers ohne Promotor in den Leserahmen. Das Ergebnis ist ein Fusionsprotein mit einer verkürzten Version des Zielgens. Dies bedeutet, dass das auszuschaltende Gen eine starke und konstitutive Promotoraktivität aufweisen und das Fusionsprodukt ein lösliches Protein sein muss, damit der Selektionsmarker APHVIII aktiv ist.

Ein neuer Ansatz mit synthetisch hergestellten Zinkfingernukleasen (ZFN) eröffnete dem Forschungsgebiet die Möglichkeit gezielter Knockouts mit programmierbaren Nukleasen in *C. reinhardtii*. Sizova *et al.* gelang es, das *ChR1*-Gen zu inaktivieren (2013). In etwa 1 % der vorselektierten Klone fand eine Inaktivierung im Zielgen statt. Die Arbeit mit ZFNs gestaltete sich aber schwierig und diese Methode wurde bisher durch keine weitere an *C. reinhardtii* arbeitende Arbeitsgruppe aufgenommen.

RNA-Interferenz

Eine Alternative zur Geninaktivierung ist die Hemmung der Genexpression durch RNA-Interferenz (RNAi). In *Volvox carteri* konnte anhand des *Volvoxopsin*-Gens *VOP* zum ersten Mal die Funktionsweise der RNA-Interferenz in Grünalgen gezeigt werden (Ebnet *et al.* 1999). Kurz darauf wurde diese Technik durch ein Knockdown des *Chlamyopsins* (*COP1/2*) auch in *C. reinhardtii* angewendet (Fuhrmann *et al.* 2001). Durch Verbesserungen wie die gleichzeitige Suppression des *MMA7*-Gens und Selektion auf 5-Fluorindol (Rohr *et al.* 2004),

künstliche mikroRNA Konstrukte (amiRNA, Molnar *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2009) und induzierbare Hemmung (Schmollinger *et al.* 2010) fand die RNAi-Technologie eine breite Anwendung in *C. reinhardtii*. Es gibt jedoch auch Einschränkungen bei dieser Technik: Die Hemmung der Genexpression durch RNAi ist unvollständig, variiert zwischen Experimenten und Laboratorien und kann zu unvorhersehbarer Inhibierung anderer Gene führen.

Insertionsbibliotheken

Eine andere Möglichkeit, Gene zu inaktivieren, ist die zufällige Integration von Markergenen und das anschließende Screenen Tausender Klone. In *Arabidopsis* führte dieser Ansatz zu einer riesigen Samenbank an T-DNA-Linien, in denen nahezu jedes (nicht-letale) Gen inaktiviert ist (Alonso *et al.* 2003). Ein entsprechendes Projekt konnte mit dem *Chlamydomonas Library Project (CLiP)* auch in der Grünalge verwirklicht werden (Li *et al.* 2016, 2019). Diese Stammsammlung umfasst mehr als 60.000 Mutantenstämme und ist insofern einzigartig, da alle *C. reinhardtii*-Stämme ständig in Kultur gehalten werden müssen.

1.3.2 CRISPR in *C. reinhardtii*

Mehrere Arbeitsgruppen arbeiteten an der Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in *C. reinhardtii*, jedoch gestaltete sich die Umsetzung schwieriger als in anderen Organismen. Üblicherweise werden die Cas9-Nuklease und die zugehörige (s)gRNA über ein Plasmid in die Zielzelle gebracht, das die Expression der beiden Komponenten induziert. Allerdings gestaltete sich gerade die Expression der großen Cas9-Nuklease (1380 AS) in *C. reinhardtii* als ineffizient. Dr. Jiang verglich unterschiedliche Expressionskonstrukte und konnte auch die Aktivität des Cas9/sgRNA-Komplexes in dem selektierbaren Gen *FKB12* in einem Genpool mit einer Frequenz von 10^{-9} bzw. $3,3 \times 10^{-7}$ nachweisen. Diese Effizienz reichte jedoch nicht aus, um einzelne Mutantenzellen zu isolieren (Jiang *et al.* 2013b; Jiang & Weeks 2017). Parallel zu dieser Arbeit wechselten zwei Arbeitsgruppen daraufhin die Strategie und stellten rekombinantes Cas9-Protein und *in vitro* transkribierte sgRNA her, was zu einem funktionellen Cas9/sgRNA Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex assembliert wurde. Durch die Transformation der Cas9/sgRNA-RNPs konnten die Reportergene *FTSY* (Baek *et al.* 2016), *MAA7*, *CpSRP43* und *ChIM* (Shin *et al.* 2016) inaktiviert werden. Die Frequenz der mutierten Zellen lag bei maximal $3,0 \times 10^{-5}$, was 1,4 % der analysierten Zellen entsprach. Dieses Protokoll konnte auch auf die alternative CRISPR-Nuklease Cas12a aus *Lachnospiraceae bacterium ND2006* (*LbCas12a*) ausgeweitet werden (Ferenczi *et al.* 2017). Hier wurden Mutationsfrequenzen in den Reportergenen *CpFTSY*, *CpSRP43*, *PHT7* und *FKB12* von bis zu 10 % erreicht. Außerdem wurden präzise Insertionen eines Poly-His-Tags durchgeführt. Trotz dieser Verbesserungen konnte noch kein nicht-selektierbares Gen ausgeschaltet werden.

1.4 DNA-Reparatursysteme

Die Herstellung von Gen-Modifikationen mithilfe von DNA-DSBs beruht auf der zelleigenen DNA-DSB-Reparatur. Alle Organismen entwickelten im Laufe der Evolution DNA-Reparatur-Mechanismen, da Schäden der DNA durch eine Vielzahl interner, externer, biotischer und abiotischer Faktoren verursacht werden können. Abhängig von der Art des Defekts werden unterschiedliche evolutionär hoch konservierte Reparaturen durchgeführt (zusammengefasst in de Medeiros *et al.* 2015).

1.4.1 Einzelbasen-Reparaturen

Einige spezifische Mutationen, die durch UV-Strahlung und DNA-Alkylierung verursacht werden, können durch eine direkte enzymatische Umkehrung repariert werden. So können die durch UV-B (290–320 nm) Strahlung induzierten Pyrimidin-Dimere durch die hoch konservierten Enzyme Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer(CPD)- oder 6-4-Photoprodukt(PP)-Photolyasen aufgelöst werden, die in *C. reinhardtii* durch die Gene *PHR1*, *PHR2* und *aCRY* codiert werden (Petersen *et al.* 1999; Petersen 2001; Franz *et al.* 2018). Modifizierte Basen wie beispielsweise alkyliertes Guanin (O6-MeGua), das fälschlicherweise mit Thymin anstelle von Cytosin paart, können durch das Entfernen der Methylgruppe durch Methylguanin-Methyltransferasen repariert werden.

Anstelle einer direkten Reparatur der beschädigten Nukleotide können einzelne Basen durch die Basen-Exzisionsreparatur aus der DNA entfernt werden. Hierbei können Basen repariert werden, die durch eine Desaminierung, Oxidation, Alkylierung oder spontane Hydrolyse modifiziert sind. Im ersten Schritt werden defekte Basen durch die DNA-Glykosylase erkannt und herausgeschnitten. Die so generierte Purin- bzw. Pyrimidin-Lücke (AP-Stelle) wird durch AP-Endonukleasen, die Polymerase β bzw. δ und schließlich durch die DNA-Ligasen III bzw. I wieder aufgefüllt und repariert. Das Gerüstprotein XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) bildet die Struktur des BER-Komplexes. Poly-(ADP-ribose)-Polymerase(PARP)-Proteine binden einzelsträngige DNA-Brüche und sind an der Signalweiterleitung beteiligt. Diese Vorgänge sind in Bakterien und Säugetierzellen gut beschrieben (Krokan & Bjoras 2013). Ob und durch welche Enzyme diese Vorgänge jedoch in Grünalgen oder Pflanzen durchgeführt werden, ist noch ungeklärt. Einige homologe Proteine wie z. B. die Polymerase β und die Ligase III fehlen zwar in diesen Genomen, ihre Funktion könnte aber durch die Polymerase λ bzw. die Ligasen I und IV übernommen werden. Homologe Proteine zu XRCC1 und PARP sind zwar in Pflanzen vorhanden, fehlen allerdings in Grünalgen (Roldán-Arjona & Ariza 2009).

Größere DNA-Schädigungen wie UV-induzierte CPDs, 6–4 PPs, Fehlpaarungen oder Verformungen der DNA-Doppelhelix, die den Austausch mehrerer Nukleotide erfordern, können durch die Nukleotid-Exzisionsreparatur wiederhergestellt werden (Wood *et al.* 2000). Hierbei werden die defekten Nukleotide in einem 24-32 nt langen Oligonukleotidstrang entfernt und anhand des komplementären Gegenstranges wieder aufgefüllt. Daran sind

mehr als 30 Gene beteiligt, die in allen eukaryotischen Organismen inklusive Pflanzen hoch konserviert sind.

Bei der Replikation der DNA kommt es trotz der Korrekturfähigkeit der DNA-Polymerasen in seltenen Fällen (10^{-8}) zum Einbau einer falschen Base. Solche Fehlpaarungen führen neben der eigentlichen Mutation zu Veränderungen der DNA-Struktur und -Faltung und blockieren die Replikation und Transkription. Um speziell solche Fehler zu beheben, entwickelte sich die Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair*, MMR), die in pro- und eukaryotischen Systemen nach dem gleichen Mechanismus abläuft. Ein Heterodimer aus MutSa-MutLa bildet eine Ringstruktur und wandert die doppelsträngigen DNA entlang. Trifft er auf Verformungen, werden entsprechende Helikasen und Exonukleasen rekrutiert. Die MMR ist eng mit der DNA-Replikation verbunden. Das Einfügen der Base und das anschließende Verschließen wird durch die bei der Replikation involvierte Polymerase δ und Ligase I katalysiert. Mithilfe der MMR kann die Fehlerrate auf bis zu 10^{-10} reduziert werden.

1.4.2 Nicht- und mikrohomologe DSB-Reparaturen

Die folgenreichste DNA-Schädigung ist der DNA-Doppelstrangbruch. Wird ein DSB nicht repariert, kann es zu einer fehlerhaften Aufteilung der Chromosomen während der Zellteilung kommen, was zum Zelltod führt. Es ist somit nicht erstaunlich, dass sich gleich mehrere miteinander konkurrierende Reparaturmechanismen entwickelt haben. Die Systeme unterscheiden sich in ihrer Effizienz, der Genauigkeit und Häufigkeit ihres Vorkommens. DNA-Doppelstrangbrüche sind auch die Grundlage für die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden der Gen-Veränderung, deren Ergebnis von den im Folgenden beschriebenen DNA-Reparaturmechanismen abhängt.

Der einfachste und vorherrschende Mechanismus ist die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ oder cNHEJ). Bei einem DNA-DSB wird zuerst versucht, die beiden Enden wieder zusammenzufügen. Im Falle eines sauberen Bruchs führt eine solche Ligation zu einer fehlerfreien Reparatur (Abbildung 1.9, „NHEJ“). Nach der Bildung eines DSBs bindet ein Heterodimer aus KU70 und KU80 an die DNA-Enden und rekrutiert weitere Reparaturfaktoren wie beispielsweise den trimerischen MRN-Komplex aus MRE11, RAD50 und NBS1. Der MRN-Komplex bringt beide Enden zueinander, wodurch sie mithilfe der Ligase IV und XRCC4 ligiert werden können. Kam es an den DNA-Enden jedoch zu Modifikationen oder zum Verlust einzelner Basen, können Fehler entstehen, weshalb die NHEJ zwar ein sehr direkter und schneller Mechanismus ist, jedoch auch zu Mutationen führen kann.

Befindet sich der DSB in einer repetitiven Sequenz von 5-25 Basen, kann ein alternativer NHEJ Mechanismus zum Tragen kommen. Faktoren der Mikrohomologie-vermittelten Endverknüpfung (MMEJ) erkennen und paaren homologe Sequenzen beider DNA-Enden, womit es zu einem Sequenzverlust kommt (Abbildung 1.9, „MMEJ“).

1.4.3 Homologie-vermittelte DSB-Reparaturen

Werden längere homologe Bereiche der zu reparierenden DNA-Enden detektiert, kommt es bei der Einzelstrang-Paarung (SSA) zum Abbau der DNA an den 5'-DNA-Enden. Die dadurch entstehenden Einzelstränge binden anschließend an ihr homologes Gegenstück und schließen somit den DSB. Wie bei der MMEJ kommt es auch hier unweigerlich zu einem Sequenzverlust und folglich zu Mutationen (Abbildung 1.9, „SSA“).

Eine weitere Möglichkeit, einen DSB zu reparieren, ist die homologe Rekombination (HR). Die HR nutzt homologe Sequenzen des Schwesterchromatids oder des homologen Chromosoms als Vorlage, um DNA-Sequenzen fehlerfrei zu reparieren oder auszutauschen. Historisch gesehen ist die HR schon lange bekannt und für ihre Entdeckung erhielt Thomas Hunt Morgan 1933 den Nobelpreis. Die HR ist nicht nur ein Mechanismus, um DNA-Schäden in somatischen Zellen zu reparieren, sondern wird während der meiotischen Zellteilung durch die Zelle aktiviert, um genetische Informationen zwischen zwei homologen Chromosomen neu zu rekombinieren und damit genetische Diversität zu ermöglichen. Dies bildet die Grundlage für die Fähigkeit aller Organismen, sich der Umwelt anzupassen und weiterzuentwickeln.

Der DSB aktiviert den MRN-Komplex und die Exonukleasen COM1 und EXO1, die die DNA in 5'->3'-Richtung über mehrere Hunderte bis Tausende Basen abbauen. Die freien einzelsträngigen 3'-Enden werden durch die Einzelstrang-Bindeproteine RPA stabilisiert und formen mit der Rekombinase RAD51 und BRCA2 ein Nukleoprotein-Filament, das nach homologen Sequenzen sucht. Unter Bindung weiterer Faktoren wie Rad54 und ATP-Verbrauch bricht der Einzelstrang-Komplex die Doppelhelix der homologen Donor-DNA auf und paart sequenzspezifisch mit dem komplementären DNA-Strang. Nun kann der Einzelstrang an seinem 3'-Ende nach Vorlage des Schwesterchromatids verlängert werden. Die durch den DSB geschädigte DNA ist nun mit der Donor-DNA verbunden und formt den *displacement loop* (Verdrängungsschleife, *D-loop*). Ausgehend vom *D-loop* gibt es zwei Auflösungsmöglichkeiten, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Eine Variante ist die Synthese-abhängige Strang-Paarung (SDSA). Der Einzelstrang löst sich wieder von der Donor-DNA und kann durch seine Verlängerung beide Enden des DSB binden und damit schließen. Die Lücke im komplementären Strang wird durch Polymerasen wieder aufgefüllt. Hierbei kommt es zu keinem Crossing-over, die Donor-DNA bleibt also unverändert (Abbildung 1.9, „SDSA“).

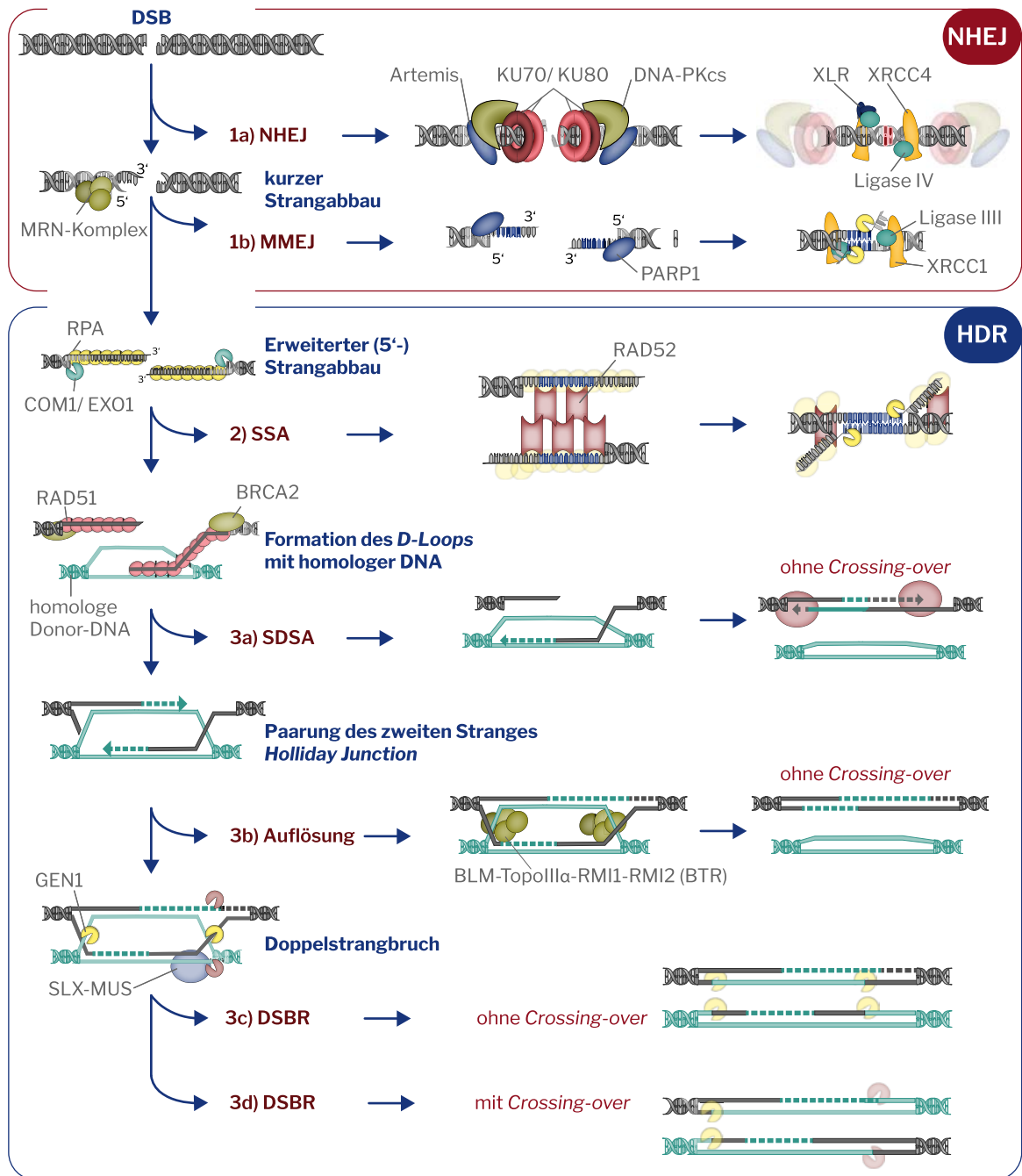


Abbildung 1.9: Reparaturmechanismen nach einem DNA-Doppelstrangbruch

DNA-Stränge werden durch nicht-homologe Strang-Reparaturen (**1**) unter Sequenzverlust durch die nicht-homologe Endverknüpfung (**1a** NHEJ) oder durch die Mikrohomologie-vermittelte Endverknüpfung (**1b** MMEJ) wieder verbunden. Wird das 5'-Strangende abgebaut, kann das freie 3'-Ende mithilfe der Homologie-vermittelten Reparaturmechanismen (**2+3** HDR) mit komplementären DNA-Sequenzen paaren und repariert werden. Die Einzelstrang-Paarung (**2** SSA) nutzt homologe Sequenzen im gleichen DNA-Strang, wodurch es zum Verlust von Sequenzinformationen kommt. Bindet homologe DNA eines anderen DNA-Strangs (Donor-DNA, z. B. ein Schwesterchromatid), bildet sich der *displacement loop* (D-Loop) und initiiert die Reparatur durch die fehlerfreie homologe Rekombination (**3** HR). Die Synthese-abhängige Strang-Paarung (**3a** SDSA) involviert die Reparatur von nur einem DNA-Strang. Bindet auch der zweite Strang, bildet sich die sogenannte *Holliday Junction*. Ohne Überkreuzung der DNA-Stränge kann sich die Struktur direkt auflösen (**3b**). Die Doppelstrangbruch-Reparatur (**3c+d** DSBR) schneidet die vier überkreuzten DNA-Stränge, wobei es zum Crossing-over kommen kann. Abbildung nach Brandsma & Gent (2012) und Schröpfer *et al.* (2014).

Der klassische Fall der HR umfasst die Doppelstrangbruch-Reparatur: Kann sich der *D-loop* stabilisieren, bindet auch der zweite freie Einzelstrang an den komplementären Strang der Donor-DNA und es bildet sich die kreuzförmige *Holliday-Junction*. Die beiden Einzelstränge werden anhand der komplementären Vorlage durch Polymerasen verlängert und die Lücken um den DSB können mithilfe von Ligasen geschlossen werden. Damit ist der DSB zwar repariert, jedoch ist die Donor-DNA immer noch kreuzweise mit dem ursprünglichen DNA-Strang verknüpft. Um die Reparatur abzuschließen, müssen die *Holliday-Junctions* aufgelöst werden. Dies wird durch die GEN1-Resolvasen ausgeführt, die jedoch nicht unterscheiden, welcher DNA-Strang ursprünglich Teil der Donor-DNA oder des beschädigten DNA-Stranges war. Dies führt dazu, dass in einem Fall die DNA-Stränge vertauscht werden, es also zu einem *Crossing-over* kommt und die genetischen Informationen ab der Stelle des DSBs zwischen zwei Schwester-Chromatiden bzw. Chromosomen neu kombiniert werden (Abbildung 1.9, „DSBR“).

1.4.4 Beeinflussung der Reparatursysteme und Mutationsraten

Wie im vorherigen Kapitel erläutert, haben Zellen eine ganze Reihe von Mechanismen entwickelt, um DNA-Schäden und DSBs zu reparieren. Nutzt man programmierbare Nukleasen, um DSBs zu erzeugen, bestimmen diese Reparaturmechanismen, wie der DNA-Bruch repariert wird und ob bzw. zu welcher Mutation das führt. Als Anwendung, um Gene zu verändern, wird dabei hauptsächlich unterschieden, ob das Ergebnis eine ungerichtete, zufällige Mutation oder eine gezielte Sequenzänderung mithilfe einer Donor-DNA ist. Zufällige Mutationen, wie die Deletion oder Insertion einiger Basen, können zu einer Verschiebung des Leserahmens führen, wodurch ein Gen ab der Stelle des DSB seine Funktion verliert. Sie sind hauptsächlich das Ergebnis durch Reparaturen des NHEJ und MMEJ und sind erwünscht, wenn das Zielgen inaktiviert werden soll. Für gezielte Sequenzänderungen, wie das Einfügen oder den gezielten Austausch von Genabschnitten, wird neben der Nuklease eine Donor-DNA benötigt, die die gewünschte Mutation enthält. Diese Donor-DNA wird von der HR und SSA als Substrat für die DNA-Reparatur benutzt und deshalb unter Homologie-vermittelte Reparatursysteme (HDR) zusammengefasst. Will man eine gezielte Genveränderung einbringen, stören die Mechanismen der NHEJ. Außerdem zeigte sich, dass in den meisten eukaryotischen Organismen DSBs hauptsächlich durch NHEJ repariert werden (Lieber 2010; Davis & Chen 2013; Puchta & Fauser 2013; Ren *et al.* 2014). Um also gezielte Genveränderungen durchzuführen, wird aktiv an Methoden geforscht, die das NHEJ unterbinden bzw. die HDR erhöhen.

Ein weit verbreiteter Ansatz ist die Hemmung von NHEJ-Enzymen. In mehreren Organismen wurde gezeigt, dass die Inaktivierung oder chemische Inhibition des KU70/KU80-Dimers, des XRCC4-Proteins, des DNA-PKcs-Enzyms oder der Ligase IV die NHEJ-Mutationen senkt und somit die Rate an HDR-Mutationen erhöht (Pierce 2001; Gratz *et al.* 2014; Chu *et al.* 2015; Maruyama *et al.* 2015; Robert *et al.* 2015). Alternativ kann durch Überexpression oder chemische Induktion von HR-Genen wie z. B. *Rad51* und *Rad52* die homologe Rekombination stimuliert werden (Song *et al.* 2016; Shao *et al.* 2017).

1.5 Zielsetzung

Das Genom der Grünalge *C. reinhardtii* enthält 15 potenzielle Photorezeptorgene. Darunter befinden sich sechs Histidin-Kinase-Rhodopsine, die eine neue, noch wenig untersuchte Klasse mit bislang unbekannter physiologischer Funktion formen. Um die physiologische Funktion dieser und anderer Gene zu studieren, sollte eine Methode entwickelt werden, um Gene im Kerngenom der Grünalge *C. reinhardtii* gezielt zu inaktivieren oder zu modifizieren. Dazu sollte folgendermaßen vorgegangen werden:

- Als erste Möglichkeit sollte die Verwendung von programmierbaren Zinkfinger-Nukleasen so optimiert werden, dass auch eine Anwendung in motilen Stämmen möglich wird. Limitierend war bisher die niedrige Transformationseffizienz, das aufwendige Design neuer Zinkfinger-Bindedomänen und die Notwendigkeit eines Selektionssystems für Mutanten. Dies alles sollte durch die neue Transformationsmethode mittels Elektroporation überwunden werden.
- Aufgrund des zeitintensiven Prozesses ZFNs mit einer neuen Zielsequenz herzustellen, wäre die CRISPR/Cas9-Nuklease das präferierte Mittel, um Doppelstrangbrüche zu generieren. Da eine genetisch-basierte Expression der Cas9-Nuklease erfolglos blieb, sollten alternative Wege wie die direkte Transformation von rekombinanten Cas9-Protein in die Zellen evaluiert werden.
- Langfristig sollen nicht nur Geninaktivierungen, sondern auch gezielte Genveränderungen durchgeführt werden. Am Beispiel des *COP1*- und *Chr2*-Gens sollten Fluoreszenzreportergenen präzise in den endogenen Leserahmen eingefügt werden.
- Gezielte Mutationen, die durch die HDR eingeführt wurden, sind seltener als zufällige Mutationen durch die NHEJ-Reparatur. Es sollte ein System etabliert werden, um HDR-Mutationen zu messen und mögliche Einflussgrößen zu untersuchen, um schließlich die HDR-Rate zu verbessern.
- Abschließend sollten die generierten Photorezeptormutanten ersten physiologischen Untersuchungen unterzogen werden, um die Phototaxis, Adhäsion der Flagellen und die zirkadiane Rhythmik zu untersuchen.



2 Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Software

Tabelle 2: Geräte und ausgewähltes Verbrauchsmaterial

Gerät und Anwendung	Model	Hersteller
Aufnahme von DNA- und Protein-Gelbildern	ChemiDoc MP	Bio-Rad
Brutschrank zur Inkubation von Algen-Flüssigkulturen	Innova 44	New Brunswick Scientific
Brutschrank zur Inkubation von Bakterienkulturen	Innova 4200	New Brunswick Scientific
Elektroporator für Algentransformationen	NEPA21 electroporator	Nepa Gene Co
Lichtschrank zur Inkubation von Algen-Plattenkulturen	IPP 750 ^{PLUS}	Memmert
PCR-Thermostyzykler	peqSTAR Thermocycler	peqlab
Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie	EVOS FL Digital Inverted Microscope	life technologies
Spektrophotometer zur DNA-Konzentrationsbestimmung	BioSpectrometer Basic	Eppendorf
Sterilbank	022903	Kojair
Vortexer	Heidolph Vortex 54117	Heidolph
Wärmeversiegelung von 96-Well PCR-Platten	Heat sealer 96-well	Eppendorf
Zellometer für <i>C. reinhardtii</i> -Zellen	Cellometer Vision	Nexcelom Bioscience
Zentrifugation von 96-Well Platten und >15 ml	Heraeus Megafuge	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugation von Mikrogefäßen bis 2 ml	Microcentrifuge 5420 / MiniSpin Plus	Eppendorf
Laborbedarf	Artikel-Nr.	Hersteller
6-Well Mikrotiterplatten	734-2777	VWR
12-Well Mikrotiterplatten	734-2779	VWR
24-Well Mikrotiterplatten	734-2780	VWR
48-Well Mikrotiterplatten	734-2780	VWR
96-Well Mikrotiterplatten	734-2782	VWR
96 V-Well Mikrotiterplatten	651 180	Greiner Bio-One
96-Well PCR-Platten	4TI-0750	4titude
Alufolien zur Versiegelung von Mikrotiterplatten	1814045	Bio-Rad
Elektroporationsküvetten 400 µl, Spaltbreite 2 mm	732-1136	VWR

Alle Chemikalien wurden von *Carl Roth* und *Sigma-Aldrich (Merck KGaA)* bezogen. Enzyme, Enzym-Kits und die dazugehörigen Puffer wurden von *Thermo Fisher Scientific Inc.* bezogen. Abweichende Hersteller sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Chemikalien, Enzyme und Kits.

TFS = *Thermo Fisher Scientific Inc.*; IDT = *Integrated DNA Technologies Inc.*, Roche = *Hoffmann-La Roche AG*; Roth = *Carl Roth GmbH + Co. KG*; MM = Master Mix, *Sigma-Aldrich* ist *Merck KGaA* (Darmstadt);

Name	Artikel.-Nr.	Hersteller (Ort)	Verwendungszweck
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-Sulfat (X-SO ₄)	B-7600	Biosynth AG (Staad)	“Blau-Grün“-Test
Agar-Agar	6494.2	Roth (Karlsruhe)	Agar-Platten
Agarose Standard	3810.4	Roth (Karlsruhe)	DNA-Gele
Ampicillin	A-9393	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	Antibiotikum für <i>E. coli</i>
Betain	B2629	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	PCR-Additiv
Cefotaxim	C7039	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	Antibiotikum
D-Saccharose	4621.1	Roth (Karlsruhe)	Elektroporationspuffer
DreamTag Green PCR MM	K1081	TFS (Waltham, MA)	Kolonie-PCR (<i>E. coli</i>)
DUPLEX-Puffer	11-01-03-01	IDT (Coralville, IA)	Herstellung von doppelsträngiger DNA
FastDigest <i>Eco31I</i>	FD0294	TFS (Waltham, MA)	Restriktionsenzym
FastDigest <i>Esp3I</i>	FD0454	TFS (Waltham, MA)	Restriktionsenzym
GeneRuler 1 kb Plus	SM1331	TFS (Waltham, MA)	DNA-Ladder
Glasperlen 0,4 – 0,6 mm	BBI 8541791	Sartorius AG (Göttingen)	Algentransformation
Hygromycin B	10843555001	Roche (Basel)	Antibiotikum
IDTE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer pH 7,5)	11-01-02-02	IDT (Coralville, IA)	Resuspension von DNA & RNA-Oligonukleotiden
L-Arginine	A-5006	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	Algenmedien
LB-Medium	X968.3	Roth (Karlsruhe)	<i>E. coli</i> -Medium
MAX Efficiency Transformation Reagent for Algae	A24229	TFS (Waltham, MA)	Elektroporationspuffer zur Algentransformation
Midori Green Advance DNA Stain	617004	Biozym Scientific GmbH, Hessian Oldendorf	DNA-Färbung in Agarose-Gelen
Midori Green Direct DNA Stain	617006	Biozym Scientific GmbH, Hessian Oldendorf	DNA-Färbung in Agarose-Gelen
NucleoBond Xtra Maxi Plus	740416.50	Macherey-Nagel (Düren)	Plasmid-DNA Maxi-Prep
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	740609	Macherey-Nagel (Düren)	PCR Clean-up
NucleoSpin Plasmid EasyPure	740727	Macherey-Nagel (Düren)	Plasmid-DNA Mini-Prep
Paromomycin	P-9297	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	Antibiotikum
PEG 6000	0158	Roth (Karlsruhe)	Algentransformation
Phire Plant Direct PCR Master Mix	F160L	TFS (Waltham, MA)	Kolonie-PCR (Algen)
Rotiphorese 10x TBE-Puffer	3061.1	Roth (Karlsruhe)	DNA-Gelelektrophorese
T4 DNA Ligase	EL0012	TFS (Waltham, MA)	Ligation

Name	Artikel.-Nr.	Hersteller (Ort)	Verwendungszweck
T4 Polynucleotide Kinase (PNK)	EK0032	TFS (Waltham, MA)	Phosphorylierung von Oligonukleotiden
tracrRNA	1072533	IDT (Coralville, IA)	Cas9-RNP
Zeocin	ant-zn-05	InvivoGen (San Diego, CA)	Antibiotikum für Algen

2.1.2 *E. coli*-Zelllinien

E. coli-Zellen wurden in LB-Medium (Carl Roth) mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37 °C entweder in Flüssigkultur bei 180 rpm oder auf Agarplatten mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar inkubiert.

Tabelle 4: Genotypen der *E. coli*-Zelllinien

Name	Genotyp
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i> ⁴
XL1-Blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> Δ <i>M15</i> Tn10 (Tet ^R)] ⁵
Rosetta 2 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R) ⁶

2.1.3 Algenstämme, Medien und Kulturbedingungen

C. reinhardtii-Flüssigkulturen wurden in TAP-Medium (Tabelle 6) bei 110 rpm entweder unter Dauerlicht (5-8 W/m²; Sylvana GRO-LUX WIDE Spectrum F20T12/GRO/AQ/WS) bei 24 °C oder in einem Tag-Nacht-Lichtrhythmus (14 h Licht (5-8 W/m²) bei 25 °C und 10 h Dunkelheit bei 18 °C) gehalten. Kulturen auf Agarplatten oder in 96-Well-Platten wurden im Lichtschrank unter Dauerlicht (3-6 W/m²) bei 25 °C inkubiert. Zur langfristigen Aufbewahrung der Algenstämme, wurden die Algenkulturen auf Schrägagar in HSA-Medium bei 16 °C und unter einem 14 h/ 10 h Tag-Nacht-Lichtrhythmus inkubiert und alle 3 Monate auf frisches Medium umgesetzt.

Neu generierte Stämme sind im Anhang in Tabelle 33 (S. 124) aufgeführt.

Tabelle 5: Selektive Medien zur Selektion von transformierten *C. reinhardtii*-Zellen

Medium	Antibiotikum (Endkonzentration)	Selektionsplasmid (Nummer)
TAP	<i>ohne</i>	pARG7 (p230)
TAP-Paro	Paromomycin (12 µg/ml)	pAPHVIII (p075)
TAP-Hyg	Hygromycin (10 µg/ml)	pAPHVII (p360)
TAP-Zeo	Zeocin (10 µg/ml)	pBLE (p068)

⁴ <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-genotypes-genetic-markers.html> (aufgerufen am 14.12.2019)

⁵ <https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf> (aufgerufen am 14.12.2019)

⁶ http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Rosetta-2DE3-Singles-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-71400 (aufgerufen am 14.12.2019)

Tabelle 6: Algen-Nährstoffmedien

Alle Lösungen wurden autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

TAP-Medium, Tris-Acetat-Phosphat-Medium nach Gorman und Levine (1965)		
	für 1 l	Konzentration im 1x Medium
40x TAP-Konzentrat	25 ml	20 mM Tris, 1 mM (K)PO ₄ , ~18,75 mM HAc
40x Beijerinck-Salze	25 ml	7,47 mM NH ₄ Cl; 0,406 mM MgSO ₄ · 7 H ₂ O; 0,34 CaCl ₂ · 2 H ₂ O
Kropat's Spurenelemente	7 ml	(siehe unten)
ddH ₂ O	auf 1 l	
Mit Essigsäure auf pH-Wert 7,0 einstellen	~1 ml	
40x TAP-Konzentrat	für 1 l	Konzentration
Tris	96,9 g	0,8 M
(K)PO ₄ (1 M)	40 ml	40 mM
Mit Essigsäure (96 %) auf pH 7,0 einstellen	~44 ml	0,75 M
ddH ₂ O	ad 1 l	
1 M (K)PO₄ Phosphatpuffer	für ~ 420 ml	Konzentration
1 M K ₂ HPO ₄ (57 g in 250 ml H ₂ O)	250 ml	0,6 M
Mit 1 M KH ₂ PO ₄ (27,22 g in 200 ml H ₂ O) auf pH 7,0 einstellen	~170 ml	~0,4 M
40 x Beijerinck-Salze	für 1 L	Konzentration
NH ₄ Cl	16 g	0,3 M
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4 g	16,2 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2 g	13,6 mM
7er Spurenelemente nach Kropat et al (2011)	Konzentration im 1x Medium	
Fe ³⁺	20 µM	
Zn ²⁺	2,5 µM	
Cu ²⁺	2,0 µM	
Mn ²⁺	6,0 µM	
Mo ⁶⁺	0,2 µM	
Se ⁴⁺	0,1 µM	
EDTA	57,8 µM	
Additive	Stammlösung	Konzentration im 1x Medium
Arginin ► TAP-Arg	100 mg/ml	100 µg/ml
Paromomycin ► TAP-Paro	100 mg/ml	10-12 µg/ml
Hygromycin ► TAP-Hyg	50 mg/ml	10 µg/ml
Zeocin ► TAP-Zeo	100 mg/ml	10 µg/ml
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-Sulfat X-SO ₄	30 mM	0,3 mM
Saccharose ► TAP-Suc	2 M	40 mM
Ampicillin	100 mg/ml	500 µg/ml
Cefotaxim	50 mg/ml	100 µg/ml

Tabelle 7: Verwendete *C. reinhardtii* Zelllinien.

Die Stamm-Nr. bezeichnen die Ordnungsnummern der jeweiligen Stammsammlung, von der die Stämme bezogen wurden. CC = *Chlamydomonas* Resource Center; SAG = Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen. PH = Interne Stammsammlung der AG Hegemann. CliP = *Chlamydomonas* Library Project. Referenzen: ¹⁾ = Greiner et al. 2017, ²⁾ = Sizova et al. 2013; Wachstumsbedingungen der Stämme: Arg^A= Arginin-auxotroph, Arg⁺= ARG7 komplementiert, Zc^R= Zeocin-resistent, Pm^R= Paromomycin-resistent.

Stammname	Genotyp	Nummer	Wachstum	Verwendung
CC-125 (137c)	<i>nit1, nit2</i>	CC-125		Abb. 3.4, 3.8, 3.9, 3.11
CC-3403 (RU-387)	<i>nit1 arg7-8 cw15 mt-</i>	CC-3403	Arg ^A	Abb. 3.4, 3.7, 3.8, 3.11
CC-4350 (cw15-302)	<i>cw15, nit1, nit2, arg7-8, mt+</i>	CC-4350	Arg ^A	Abb. 3.8, 3.11
CC-4533 (CliP)	<i>cw15 mt-</i>	CC-4533		Abb. 3.8, 3.11
R2- Δ chr2-D6	CC-3403-p182-p183 Δ chr2	PH009 ¹⁾	Arg ^A , Zc ^R , Pm ^R	Abb. 3.5
RR6- Δ chr1-1	CC-3403-p182-p183 Δ chr1	PH006 ¹⁾	Arg ^A , Zc ^R , Pm ^R	Abb. 3.5
RR6- Δ chr1-1- Δ chr2-B12	PH006- Δ chr2	PH012 ¹⁾	Arg ⁺ , Zc ^R , Pm ^R	Abb. 3.5
SAG 11-32b		SAG 32-11b		Abb. 3.8
SAG 73.72 (Tsubo C-8)		SAG 73.72		Abb. 3.8
ZF37	CC-4350-p60Chop1	CC-5195 ²⁾	Arg ^A , Zc ^R	Abb. 3.2

Software und Online-Tools

Für diese Arbeit wurde folgende Software verwendet:

Name	Hersteller	Version	Verwendung
Adobe Illustrator	Adobe	CC 2018 (22.1)	Abbildungen
CLC Main Workbench	QIAGEN	8.1	Klonierungssoftware und Sequenzanalyse
Image Lab	Bio-Rad	5.2.1	Gel-Imager
MS Office	Microsoft	Office 2016 für Mac (16.32)	Laborbuch, Textverarbeitung, Diagramme
OpenCFU	Geissmann 2013	3.9.0.	Koloniezähler

Für diese Arbeit wurden folgende Online-Tools verwendet:

Name	Referenz	Webseite	Verwendung
Heatmapper	Babicki et al. 2016	www.heatmapper.ca	Darstellung von Expressionsdaten
Interpro	Mitchell et al. 2019	www.ebi.ac.uk/interpro/	Vorhersage von Protein-Domänen
NCBI Primer Blast (Primer3)	Ye et al. 2012	www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	Primer-Design
Phytozome	Goodstein et al. 2012	phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html	Abfrage von genomischen Sequenzdaten

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmide und Oligonukleotide

Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus XL1-Blue und DH10b *E. coli*-Zellen über Silica-Säulen laut den Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Überprüfung der Klonierung wurde die Plasmid-DNA in kleinen Isolationen (<20 µg „Mini-prep“) aus 4 ml Flüssigkultur mithilfe des *NucleoSpin Plasmid EasyPure* (Macherey-Nagel)-Extraktionskits gewonnen. Größere Mengen an Plasmid-DNA (>100 µg „Midi/Maxi-Prep“) für die Verwendung in *C. reinhardtii*-Transformationen wurden aus 50-400 ml *E. coli* Zellen mit den *NucleoBond Xtra* (Macherey-Nagel)-Extraktionskits extrahiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten und neu hergestellte Plasmide sind in Tabelle 31 (S. 131) aufgeführt. Plasmide wurden vor der Verwendung sequenziert (LGC Genomics). Alle Plasmidkarten können unter www.chlamy.de/diss/plasmids heruntergeladen werden.

Hitze-Schock-Transformation von *E. coli*-Zellen

50 µl Aliquots Chemo-kompetenter DH10b oder XL1-Blue *E. coli* Zellen wurden aufgetaut, mit 10 ng Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitze-Schock erfolgte bei 42 °C für 45 s im Heizblock. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und auf LB Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert.

Oligonuklotide

Oligonukleotide (ODNs) wurden bei *Integrated DNA Technologies Inc.* bestellt, auf eine Konzentration von 100 µM in IDTE-Puffer eingestellt und bei -20 °C gelagert. Alle Sequenzen der als Donor-ODNs oder als PCR-Primer verwendeten OligonODNs sind im Anhang in Tabelle 30 (S. 124) zu finden. FLAG-Sequenzen, die in Donor-ODNs verwendet wurden, sind in Tabelle 17 aufgelistet

Kolonie-PCR (*E. coli*)

Die korrekte Insertion der ZF-Bindedomänen in die Expressionsplasmide wurde per Kolonie-PCR überprüft. Dazu wurden 6-12 Kolonien pro transformiertem Ligationsansatz steril gepickt, auf einer LB-Amp Platte ausgestrichen und anschließend in ein PCR-Gefäß mit 10 µl PCR-Mix getaucht. Der PCR-Mix enthielt 1x DreamTaq Green PCR Master Mix (*Thermo Fischer Scientific*) und je 0,5 µM Primer 300 und 1024.

Tabelle 8: Protokoll der Kolonie-PCR

Denaturierung	95 °C	2 min] x 35
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	57 °C	30 s	
Elongation	72 °C	80 s	
Finale Elongation	72 °C	2 min	

Kolonie-PCR (*C. reinhardtii*)

Siehe Abschnitt 2.3.4 *C. reinhardtii* Kolonie-Screening-PCRs.

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte oder verdaute Plasmid-DNA wurden durch Gel-Elektrophorese nach Ihrer Größe aufgetrennt. Agarose-Gele wurden je nach Fragmentgröße mit 1-3 % Agarose (*Carl Roth*), 1:20'000 (v/v) Midori Green Advance (*Biozym*) in 1x Tris-Borat-EDTA(TBE)-Puffer (*Carl Roth*) angesetzt. 5-10 µl PCR Produkt wurde mit 6 µl GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (*Thermo Fischer Scientific*) aufgetragen und bei 120 V für 25-30 min aufgetrennt. DNA-Gele wurden mit der ChemiDoc MP (*Bio-Rad*) unter Blaulicht visualisiert und dokumentiert.

2.2.2 Klonierung neuer Zielsequenzen in die *aphVIII*-Reparatur-Kassette

Neue Nukleasen und Protokoll-Optimierungen wurden mit dem *aphVIII*-Reparatur-Testsystem evaluiert. Neue Zielsequenzen wurden mittels Oligonukleotid-Klonierung in das *ble-eyfp-aphVIII*-Konstrukt eingebracht (Abbildung 2.1).

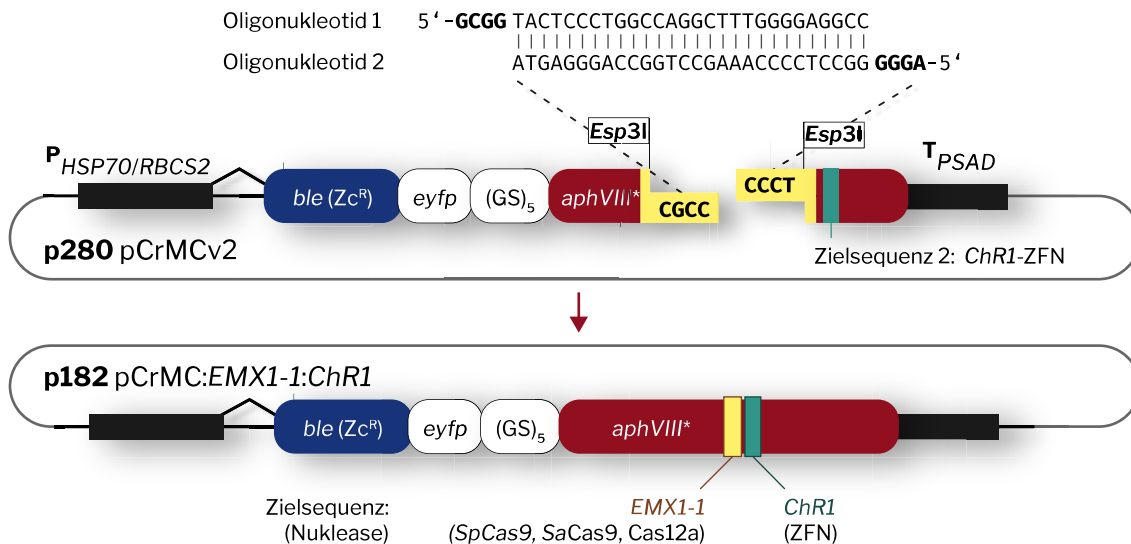


Abbildung 2.1: Oligonukleotid-Klonierung in die *aphVIII*-Testkassette

Dazu wurden zwei komplementäre Oligonukleotide (ODN), die die *EMX1-1* (GCCTCCCCAAAGCCTGGCCA) Cas9-Zielsequenz inklusive der *Sa*- und *Sp*Cas9 „NGGRRT“-PAM (*Ran et al.* 2015) enthalten mit einem „GCGG“ 5'-Überhang und einem „GGGA“ 3'-Überhang bestellt (Abbildung 2.2). Je 10 pmol ODN wurde mit 10 U T4-PNK (*Thermo Fisher Scientific*) in

1x T4 Ligase-Puffer (Thermo Fisher Scientific) für 30 min bei 37 °C phosphoryliert und durch 2 minütiges Erhitzen auf 98 °C und langsames Abkühlen (Abkühlrate 0,1 °C/s) auf 20 °C zu doppelsträngigen DNA-Molekülen vereint (Tabelle 9). Die Duplex-ODNs werden 1:200 mit H₂O verdünnt und für eine Restriktions-Ligation verwendet. Dazu wird 100 ng unverdautes Empfänger-Plasmid (p280 pCrMCv2) mit 3 µl (150 fmol) der Duplex-ODNs, 1 µl (10 U) *Esp3I*, 0,5 µl (2,5 U) T4 Ligase in 1x Ligase-Puffer verdaut und ligiert. Der Ligationsmix wird für 6 Zyklen bei 37 °C für 5 min und 21 °C für 5 min und abschließend für 5 min bei 37 °C inkubiert (Tabelle 9).

Tabelle 9: Oligonukleotid-Klonierung zum Einbau neuer Zielsequenzen in die *aphVIII*-Kassette

i) Oligonukleotid-Annealing			
Oligonukleotid 1 (100 µM)	1 µl		
Oligonukleotid 2 (100 µM)	1 µl	Inkubation	
10x T4 Ligations-Puffer	1 µl	37 °C	30 min
T4 PNK	1 µl	98 °C	2 min
H ₂ O	6 µl	20 °C	Rate: 0,1 °C/s
Gesamtvolumen	10 µl	Gesamt	ca. 1 h
ii) Verdünnung			
Duplex ODNs aus i) (10 µM)	1 µl		
H ₂ O	199 µl		
iii) Restriktions-Ligation			
p280 pCrMCv2 Vektor	0,5 µl (100 ng)		
Duplex aus ii) (50 nM)	3 µl		
<i>FastDigest Esp3I</i>	1 µl (10 U)	Inkubation	
T4 Ligase	0,5 µl (2,5 U)	37 °C	5 min
10x T4 Ligase-Puffer	1 µl	21 °C	5 min
H ₂ O	4 µl	37 °C	5 min
Gesamtvolumen	10 µl	Gesamt	ca. 1 h

5 µl der Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH10B-Zellen transformiert (Abschnitt 2.2) und Ampicillin-resistente Klone mittels Sequenzierung überprüft.

Die entstandene *aphVIII*-Testkassette enthält die *ChR1*-ZFN und die *Sp/SaCas9-EMX1-1* Zielsequenz. Zusätzlich enthält die *EMX1-1-ChR1*-Sequenz auch die Cas12a-PAM „TTTN“, wodurch auch eine Zielsequenz für *LbCas12a* und *AsCas12a* identifiziert werden konnte (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zielsequenzen der *aphVIII*-Testkassette (p182 pCrMC:EMX1-1:ChR1)

Name	Nuklease	Plasmid (p) / gRNA (r)	Zielsequenz (5' → 3')	PAM
<i>ChR1</i>	ZFN	p216/p217	CCCTCCGCCatgagcGCCGGCGGC	keine
<i>EMX1-1</i>	<i>SpCas9</i>	r11	GCCTCCCCAAAGCCTGGCCA	GGG
<i>EMX1-1</i>	<i>SaCas9</i>	r110	GCCTCCCCAAAGCCTGGCCA	GGGAGT
GTS-APH	<i>AsCas12a</i>	r31	GGGAGGCCCCCTCCGCCATGAGC	TTTG
GTS-APH	<i>LbCas12a</i>	r111	GGGAGGCCCCCTCCGCCATGAGC	TTTG

2.2.3 Design und Klonierung der *COP1/2*-Zinkfinger-Nuklease-Plasmide

Zehn potenzielle ZFN-Paare mit Schnittstellen im *COP1/2*-Gen wurden von Sigma-Aldrich entworfen. Vier Schnittstellen mit je zwei ZF-Domänen wurden ausgewählt und die dazugehörigen ZF-Bindedomänen für die Expression in *C. reinhardtii* codonoptimiert mit einem N-terminalen Kernlokalisierungssignal (MAPKKRKRKVGIHG) als synthetisches DNA-Fragment bestellt. Um die Klonierung der acht Zinkfingerdomänen zu erleichtern, wurde ein leeres ZF-Empfänger-Plasmid hergestellt (p274 pCr2-ZFN-L und p275 pCr2-ZFN-R). Die ZFN-Expression wird über den Hitzeschock-Promoter *HSP70A* (Schroda *et al.* 2000) gesteuert und durch das erste Intron des *RBCS2*-Gens verstärkt (Lumbreras *et al.* 1998). Als Nuklease-Domäne wurde die heterodimerische *FokI*-Variante (Miller *et al.* 2007) mit den „Sharkey“-Mutationen verwendet (S418P und K441E, Guo *et al.* 2010). Die ZF-Bindedomäne wurde in einer „Golden-Gate“-inspirierten Klonierung über die zwei Typ IIS-Restriktionsenzyme *BsaI/Esp3I* zwischen dem Promoter und die *FokI*-Domäne kloniert (Abbildung 2.2).

Je 5 µg der synthetisierten Plasmide mit den ZF-Bindedomänen wurden mit je 30 U *Eco31I* (#FD0293, Thermo Fischer Scientific) in 1x *FastDigest* Puffer (Thermo Fischer Scientific) bei 37 °C für 2h verdaut, auf einem 1 % TAE-Agarosegel aufgetrennt und die 407-507 bp lange Bande der ZF-Domäne mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* – Kit (Macherey Nagel) aus dem Agarosegel aufgereinigt.

Tabelle 11: Verdau der ZF-Plasmide

ZF-Plasmid-DNA	10 µl (5 µg)		
<i>FastDigest Eco3I</i>	3 µl (30 U)		
10x <i>FastDigest</i> Puffer	3 µl	Inkubation	
ddH ₂ O	14 µl	37 °C	2 h
Gesamtvolumen	30 µl		

120 ng der ZF-Domänen wurden anschließend mit 200 ng des entsprechenden ZF-Expressions-Plasmids (p274 pCr2-ZFN-L bzw. p275 pCr2-ZFN-R) mit 10 U *Esp3I* (Thermo Fischer Scientific), 5 U T4 Ligase (#EL0012, Thermo Fischer Scientific) in 1x Ligase-Puffer (Thermo Fischer Scientific) in sechs Zyklen bei je 37 °C für 5 min und 21 °C für 5 min in einer Restriktions-Ligations-Reaktion ligiert (Tabelle 12).

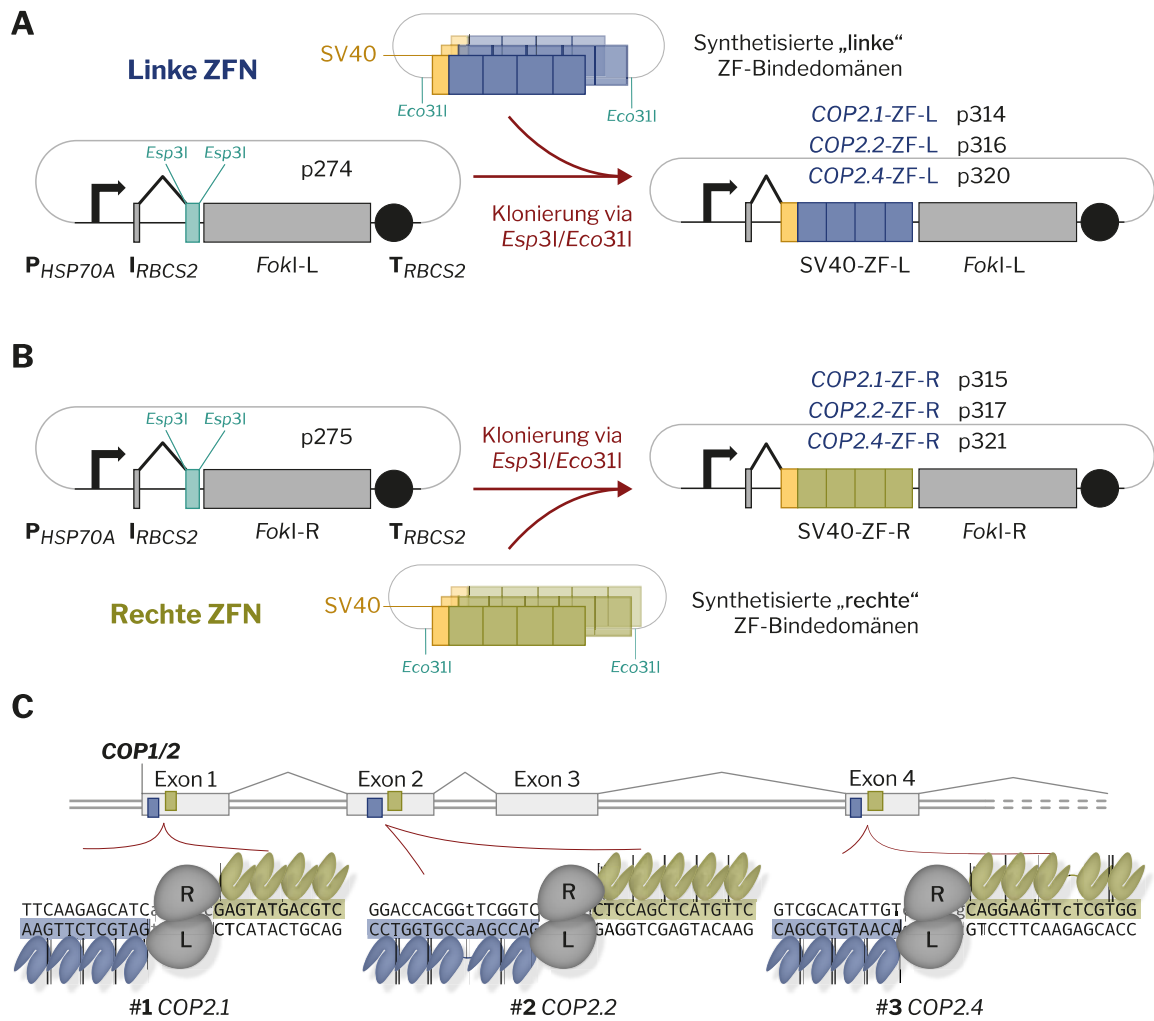


Abbildung 2.2: Klonierung der COP1/2-ZFN-Plasmide

A+B) Die synthetisierten linken (A) bzw. „rechten“ (B) Zinkfinger-Bindedomänen wurden in die Expressionsplasmide mit der linken (p274) und rechten (p275) *FokI*-Domäne kloniert. **C)** Zielsequenzen der drei ZFN-Paare in den Exons 1, 2 und 4 des *COP1/2*-Gens.

Tabelle 12: Klonierung der ZFN-Plasmide

	p314	p315	p316	p317	p320	p321	
p274 pCr2-ZFN-L	200 ng		200 ng		200 ng		
p275 pCr2-ZFN-R		200 ng		200 ng		200 ng	
COP2.1-L	120 ng						
COP2.1-R		120 ng					
COP2.2-L			120 ng				
COP2.2-R				120 ng			
COP2.4-L					120 ng		
COP2.4-R						120 ng	
<i>FastDigest</i> Eco3I			3 μ l (30 U)				Inkubation
T4 Ligase			1 μ l				} x 6
10x Ligase-Puffer			3 μ l				
ddH2O			14 μ l				
Gesamtvolumen			30 μ l				Gesamtzeit 65 min

5 µl der Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH10B-Zellen transformiert (Abschnitt 2.2.1) und Ampicillin-resistente Klone mittels Kolonie-PCR auf den korrekten Einbau untersucht (Abschnitt 2.2.1) und per Sequenzierung überprüft.

Die Zielsequenzen der verwendeten *ChR1*-ZFNs (Sizova *et al.* 2013), *ChR2*-ZFNs (Greiner *et al.* 2017) und der neu generierten *COP1/2*-ZFN-Paare sind in Tabelle 13 aufgelistet

Tabelle 13: Zielsequenzen der *ChR1*-, *ChR2*- und *COP1/2*-ZFN-Plasmide

ZFN-Paar	L-Plasmid	R-Plasmid	Zielgen	Gen-ID	Exon	Zielsequenz (L+R)
<i>ChR1</i>	p216	p217	<i>ChR1</i>	Cre14.g611300	13	<u>CCCTCCGCCatgagcGCCGGCGGC</u>
<i>ChR2</i>	p218	p219	<i>ChR2</i>	Cre02.g085257	11	<u>CCACACCGTGCCgaagggCCGGTGTCGCCA</u>
<i>COP1/2</i> #1	p314	p315	<i>COP1/2</i>	Cre01.g002500	1	<u>TTCAAGAGCATCagcggcGAGTATGACGTC</u>
<i>COP1/2</i> #2	p316	p317	<i>COP1/2</i>	Cre01.g002500	2	<u>CCTGGTGCCaAGCCAGgcattGAGGTCGAGTACAAG</u>
<i>COP1/2</i> #3	p320	p321	<i>COP1/2</i>	Cre01.g002500	4	<u>GTCGCACATTGTcaagggCAGGAAGTTcTCGTGG</u>

2.2.4 Herstellung von rekombinantem Cas9-Protein

Die rekombinanten Cas-Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und über immobilisierte Affinitätschromatographie der C-terminalen poly-Histidin-Sequenz (6x) mit Ni-NTA-Agarose laut dem Protokoll von Gagnon *et al.* (2014) aufgereinigt. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Plasmide zur Expression rekombinanter Cas-Nukleasen in *E. coli*

IPTG = Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid; His = Histidin; AB = Antibiotika-Resistenz

Name	Nummer	Nuklease	AB	Induktion
pET-28b-SpCas9-His	p197	<i>S. pyogenes</i> Cas9	Kan	IPTG
pET-28b-SaCas9-His	p268	<i>S. aureus</i> Cas9	Kan	IPTG
pDEST-hisMBP-AsCpf1	p356	<i>Acidaminococcus sp.</i> Cas12a	Kan	IPTG
pMAL-his-LbCpf1	p372	<i>Lachnospiraceae bac.</i> Cas12a	Kan	IPTG

Die Cas-Expressionsplasmide wurden in den *E. coli*-Stamm Rosetta2 (DE3) transformiert. Vier zufällig gepickte Klone wurden in einem Vortest auf ihre Expression getestet. Der am höchsten exprimierende Klon wurde in 500 ml LB-Medium mit 50 mg/ml Kanamycin bei 37 °C für 4 h bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 herangezogen, bevor er mit 1 mM IPTG induziert wurde. Die Expression wurde über Nacht bei 25 °C durchgeführt. *E. coli*-Zellen wurden im Lysepuffer (20 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, DNaseI und 0,1 mM PMSF) resuspendiert und mit einem *Emulsiflex B15* Homogenisator (Avestin) lysiert. Das Lysat wurde durch immobilisierte Affinitätschromatographie gereinigt (5 ml Nickelsäule FF-Crude, Desalt 16-60; GE Healthcare). Die Proteinkonzentration wurde durch

A260/A280 Absorption bestimmt und mit Buffer O (BO5; Thermo Fisher Scientific) auf 10 µM (3,1 mg/ml) verdünnt. Die Proteinproben wurden steril filtriert und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die in dieser Arbeit verwendeten Cas-Proteine wurden zwischen 2016 und 2019 von Thi Bich Thao Nguyen aufgereinigt.

2.2.5 Design und Verwendung der guide RNAs

Cas9- und Cas12a-Zielsequenzen wurden mithilfe verschiedener Vorhersage-Algorithmen bestimmt und nach unspezifischen weiteren Bindestellen im Genom aussortiert. Algorithmen, die die genomischen Informationen von *C. reinhardtii* unterstützen, sind in Tabelle 15 aufgeführt. Üblicherweise wurden zwei Zielsequenzen im ersten Drittel der codierenden Sequenz mit möglichst hoher Effizienz (*on-target score*) und möglichst wenigen unspezifischen Zielstellen im Genom (*off-target score*) in nächster Nähe (< 100 bp) ausgewählt. CRISPOR bietet eine Übersicht aller etablierten Scoring-Algorithmen an und wurde für viele der in dieser Arbeit verwendeten gRNAs genutzt. Zielsequenzen wurden nach hohen Scoring-Werten der Modelle von „Doench ‘16“ und „Mor.-Mateos“ ausgewählt (Moreno-Mateos *et al.* 2015; Doench *et al.* 2016).

Tabelle 15: CRISPR-Onlinetools mit Unterstützung für *C. reinhardtii*

Name	Webseite	Bemerkung	Referenz
CRISPR-P 2.0	crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/	Übersichtliche Darstellung der Zielsequenzen mit Anzeige der Exons	<i>Liu et al. 2017</i>
CRISPOR	crispor.tefor.net/	Meta-Suche mit Unterstützung mehrerer Scoring-Modelle	<i>Haeussler et al. 2016</i>
E-CRISP	www.e-crisp.org/E-CRISP/	Erweiterte Optionen	<i>Heigwer et al. 2014</i>
CCTop	crispr.cos.uni-heidelberg.de/		<i>Stemmer et al. 2015</i>

RNA-Oligonukleotide zur Verwendung als gRNAs für *SpCas9* wurden als zweikomponentige RNA synthetisch hergestellt: Die konstante tracrRNA (#1072533, IDT) und die sequenzspezifische crRNA (#Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA 2 nmol, IDT). Die genaue Sequenz der IDT Alt-R® crRNA und tracrRNA ist proprietär. Die Länge der crRNA ist 36 Nukleotide (nt) (20 nt Zielsequenz + 16 nt komplementär zur tracrRNA) und die der tracrRNA ist 67 nt⁷. Es lässt sich aber vermuten⁸, dass es sich um ähnliche oder um die identischen verkürzten Sequenzen handelt, die von Le Cong und Kollegen beschrieben wurden (Cong *et al.* 2013). Zusätzlich wurden die RNA-Oligonukleotide mit Modifikationen versehen, um die Stabilität zu erhöhen⁸:

⁷ <https://eu.idtdna.com/pages/products/crispr-genome-editing> (aufgerufen am 15.12.2019)

⁸ In inoffiziellen Vortragsfolien der IDT-Mitarbeiter Mollie Schubert und Mark Behlke werden crRNA- und tracrRNA-Sequenzen und ihre Modifikationen beschrieben: z. B. http://cropbioengineering.iastate.edu/wp-content/uploads/2018/06/Day3_Mollie-Schubert.pdf oder http://businessdocbox.com/Biotech_and_Biomedical/74849063-Optimized-chemically-modified-crna-tracrna-complexes-for-crispr-gene-editing.html (aufgerufen am 15.12.2019)

crRNA: N*N*N*NNNNNNNNNNNNNNNNNN + GUUUUAGAGCUAU*G*C*U;
 tracrRNA: A*G*CAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG
AGUCGGUGCU*U*U;

Wobei Sternchen (*) für Thiophosphorsäureester(PTO)-Schutzbindungen stehen, „N“s für die variable 20 bp Zielsequenz und unterstrichene Nukleotide für 2'-O-Methylierungen.

Für AsCas12a wurden einzelsträngige RNAs (*single guide RNA*) synthetisiert (#Alt-R CRISPR-Cpf1 crRNA 2 nmol, IDT). gRNAs für SaCas9 (r110 GCCUCCCCAAAGCCUGGCCA + GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGU UGGCGAGAUUUU) und LbCas12a (r111 AAUUUCUACUAGUGUAGAU + GGGAGGCCCCCUCCGCCAU GAGC) wurden als RNA-Oligonukleotide synthetisiert (#100 nmol RNA Oligo, IDT).

Alle RNAs wurden in RNase-freiem TE-Puffer (IDT) in einer Konzentration von 100 µM durch 1-minütiges Erhitzen auf 50 °C und kurzes Vortexen resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Alle Zielsequenzen der in dieser Arbeit verwendeten gRNAs sind im Anhang in Tabelle 32 (S. 133) aufgeführt.

2.2.6 Donor-DNAs

FLAG-Donors

In dieser Arbeit wurden verschiedene Typen von Donor-DNAs verwendet. Für die Herstellung und der Identifikation von Mutanten wurden in dieser Arbeit eine DNA-Sequenz von 28-32 bp an der Schnittstelle im Zielgen eingefügt. Diese Insertionssequenz wird in dieser Arbeit als „FLAG“-Sequenz bezeichnet. Einige Donor-DNAs enthalten homologe Bereiche zum Zielgen und umgeben die FLAG-Sequenz (Abbildung 2.3). Die FLAG_{v2}-Sequenzen beinhalten keine Zielgen-spezifischen homologen Bereiche. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Donor-ODNs sind in Tabelle 17 aufgelistet

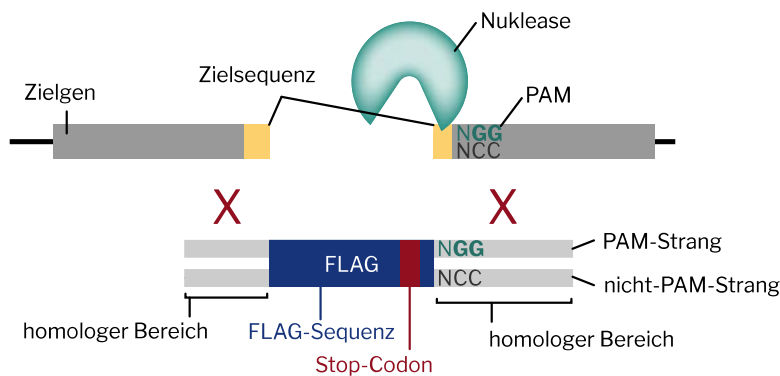


Abbildung 2.3: Aufbau der FLAG-Donor-DNAs.

Doppelsträngige kurze (<200 bp) DNA-Moleküle wurden durch Bindung von komplementären einzelsträngigen Oligonukleotiden hergestellt. Dazu wurden 10 µM komplementäre ODNs äquimolar in DUPLEX-Puffer (IDT-DNA) vermischt, für 2 min auf 95 °C erhitzt und langsam (0,1 °C/s) auf 20 °C abgekühlt.

Tabelle 16: Herstellung doppelsträngiger DNA

ODN-Mix		Inkubation	
ODN FW (100 µM)	10 µl		
ODN RC (100 µM)	10 µl	95 °C	2 min
DUPLEX-Puffer (IDT-DNA)	80 µl	20 °C	Abkühlrate: 0,1 °C/s
Gesamtvolumen	100 µl		≈15 min

Tabelle 17: FLAG-Sequenzen

Stoppcodons sind unterstrichen und rot eingefärbt. Bei „p“-Nummern handelt es sich um Plasmide (Tabelle 31), bei den sonstigen 4-stelligen Nummern um Oligonukleotide (Tabelle 30).

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung in
FLAG v1.0	AGCGCCGGTCGCGACTACAAGGACCACGACATC GACTACAAGGACGACGACGACAAGGTG <u>TAATGA</u>	p005
FLAG v1.1 IS	(AC)TA <u>TAA</u> GGACCACGACATCGACTACAAGGAC	p282, p313, p351, 1190, 1192, 1214, 1216, 1247, 1249, 1302, 1474, 1472, 1717, 1719, 1721
FLAG v1.2 HA	TACCCCTACGACGTGCCCGACTACG(CC) <u>TAA</u>	p309, p310, p312, p358, 1206, 1207, 1321, 1322, 1323, 1343, 1397, 1491, 1492
FLAG v2.0 CAPF	TTTnGATTGAAGGAAAAGTTACAACGGAGT	1502, 1559, 1477, 1797
FLAG v2.1 STOP-pure	<u>TTAGACTCTAACTAGATCA</u> Gcgg	1974/ 1975
FLAG v2.1 COP2.1rev	<u>TTAGCTAAGACTACGAGA</u> ACT <u>TCA</u> GGTAcggT <u>CTAG</u>	1939 / 1940
FLAG v2.1 EMX1-1	<u>TTAGCTAAGCCTCCCCAAAGCCTGGCCAGGGt</u> CTAG	1945 / 1946
FLAG v2.1 Zif268	<u>TTAGCTAAGC</u> CCACGCGAATTCGCGTGGGCGT <u>CTAG</u>	1998 / 1999

Donor-DNAs für die gezielte Integration von Reportergenen

Für Donor-DNAs zur Integration von mehr als 200 bp langen Genen, wurden Plasmide verwendet. Reportergene, die gezielt ins Genom integriert werden sollen, wurden mit Zielgen-spezifischen homologen Bereichen flankiert und in Plasmide kloniert. Die hier verwendeten Plasmide sind in Tabelle 18 aufgelistet und wurden durch Erik Zscheschang im Zuge seiner Masterarbeit hergestellt (Zscheschang 2018). Um die homologen Bereiche nahtlos mit unterschiedlichen Reportergenen zu fusionieren, verwendete er das modulare Klonierungssystem *cycled ligation assembly*.

Tabelle 18: Donor-Plasmide zur gezielten Integration von Reportergenen

Name	Nummer	Beschreibung	Verwendung
pHDR-COP2.9-SNAP	p368	HDR Donor-Plasmid für die Integration des SNAP-Tags im <i>COPI/2</i> -Gen.	Abbildung 3.9
pHD-COP2.9-mVenus	p369	HDR Donor-Plasmid für die Integration des mVenus-Tags im <i>COPI/2</i> -Gen.	Abbildung 3.9
pHD-ChR2.19-SNAP	p370	HDR Donor-Plasmid für die Integration des SNAP-Tags im <i>ChR2</i> -Gen.	Abbildung 3.9

2.3 Transformation von *C. reinhardtii*-Zellen

2.3.1 Transformationen mit dem *aphVIII**-Testsystem

Herstellung von *aphVIII*-Teststämmen

Neue Teststämme wurden durch Elektroporation der *aphVIII*-Testkassette (p182 pCrMC:EMX1.1:ChR1, Kapitel 2.2.2) mit einem NEPA21-Elektroporator laut den Angaben des Herstellers (Nepagene 2013) und Yamano *et al.* (2013) hergestellt. 50 ml Zellen des Stammes CC-3403 wurden in TAP-Medium mit 100 µg/ml Arginin (TAP-Arg) unter Dauerlicht (5-8 W/m²) bei 25 °C für 7-10 Tage durch regelmäßiges Verdünnen im logarithmischen Wachstum gehalten. Die Zellen wurde bei einer Zelldichte von 1-2 x 10⁶ Zellen/ml bei 1500 g für 10 min zentrifugiert und mit TAP mit 40 mM Saccharose (TAP-Suc) auf eine Zelldichte von 1 x 10⁸ Zellen/ml eingestellt. 100-1000 ng Plasmid (p182) wurde mit 40 µl Zellen vermischt und in einer 400 µl Küvette (Spaltbreite 2 mm) laut den Einstellungen in Tabelle 23 elektroporiert. Die transformierten Zellen wurden mit 600 µl TAP-Arg über Nacht in 24-Well Platten regeneriert und am nächsten Tag auf TAP-Zeo (10 µg/ml Zeocin) ausplattiert (Abbildung 2.5).

Zeocin-resistente Kolonien wurden per PCR mit den Primern 1050/1051 auf die Integration der kompletten *aphVIII*-Kassette überprüft. Vier positive Klone „a“, „b“, „c“ und „d“ wurden ausgewählt und weiterverwendet (Abbildung 3.2).

Glasperlen-Transformation

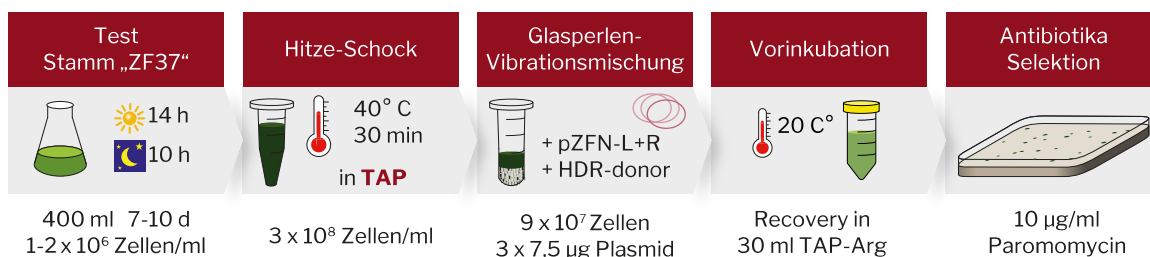


Abbildung 2.4: Transformation von *C. reinhardtii*-Zellen mit der Glasperlen-Methode
Protokoll nach Karen Kindle (1990).

Zellen des *aphVIII*-Teststamms „ZF37“ (Abbildung 3.2) wurden mit der Glasperlen-Methode laut dem Protokoll von Karen Kindle (1990) und Sizova *et al.* (2013) transformiert (Abbildung 2.4). 400 ml Zellen wurden in TAP-Medium mit 100 µg/ml Arginin unter synchronisierten Lichtbedingungen (14 h Licht bei 25 °C, 10 h Dunkelheit bei 18 °C) für 7-10 Tage durch regelmäßiges Verdünnen im logarithmischen Wachstum gehalten. Am Tag der Transformation wurden die Zellen eine Stunde vor dem Wechsel der Licht- in die Dunkelphase geerntet und auf 3 x 10⁸ Zellen/ml in TAP resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend für 30 min in einem Wasserbad einem Hitzeschock bei 40 °C ausgesetzt. 300 µl Zellen wurden zu ca. 50 mg sterilen Glasperlen gegeben und mit 100 µl 20 % PEG 6000 und je 7,5 µg der drei Plasmide pHD-*aphVIII*^{Δ120} (p183), pCr3-ZFN:ChR1-L (p216) und pCr3-ZFN:ChR1-R (p217) vermischt. Das Zell-DNA-Glasperlen-Gemisch wurde 2 x für 15 s

gevoertext und die Zellen mit 30 ml TAP-Arg über Nacht regeneriert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf TAP-Paro (Paromomycin 10 µg/ml) ausplattiert. Innerhalb von 10 Tagen bildeten sich Kolonien und die Paromomycin-resistente Klonen wurden analysiert.

Da sich die Anzahl der eingesetzten Zellen per Transformation bei der Glasperlenmethode (3×10^7 Zellen) und der Elektroporation (4×10^6 Zellen) unterscheidet, werden zur besseren Vergleichbarkeit die Anzahl der Pm^R Klone per 10^7 eingesetzten Zellen angegeben (Abbildung 3.2).

Reparatur der *aphVIII*-Testkassette durch Elektroporation von ZFN-Plasmiden

Die Elektroporation von ZFN-Plasmiden erfolgte mit einem NEPA21-Elektroporator laut den Angaben des Herstellers (Nepagene 2013) und Yamano *et al.* (2013). Jeweils 50 ml der *aphVIII*-Teststämme „a“, „b“, „c“ (Abbildung 3.2) wurden in TAP-Medium mit 100 µg/ml Arginin unter synchronisierten Lichtbedingungen (14 h Licht bei 25 °C, 10 h Dunkelheit bei 18 °C) für 7-10 Tage durch regelmäßiges Verdünnen im logarithmischen Wachstum gehalten (Abbildung 2.5).

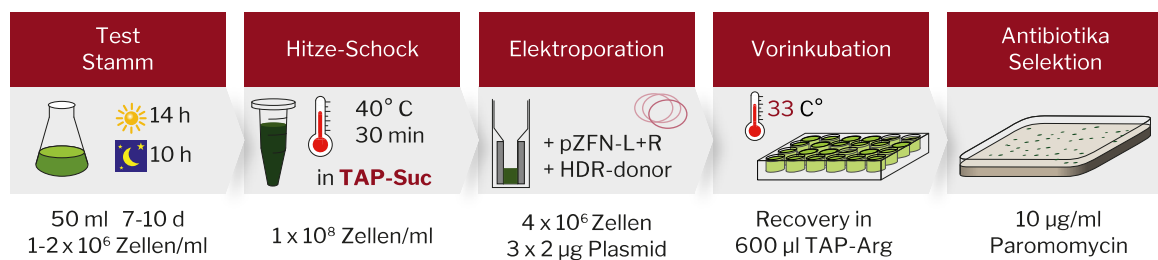


Abbildung 2.5: Transformation von ZFN-Plasmiden durch Elektroporation

Am Tag der Transformation wurden die Zellen eine Stunde vor dem Wechsel von der Licht- in die Dunkelphase bei 1500 g für 10 min pelletiert und auf 1×10^8 Zellen/ml in TAP-Suc (40 mM Saccharose) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend für 30 min im Heizblock bei 40 °C inkubiert. 40 µl Zellen (4×10^6 Zellen) wurden mit je 2 µg der drei Plasmide pHD-*aphVIII*^{Δ120} (p183), pCr3-ZFN:ChR1-L (p216) und pCr3-ZFN:ChR1-R (p217) vermischt und laut Tabelle 23 in einer 400 µl Küvette (Spaltbreite 2 mm) elektroporiert. Die transformierten Zellen wurden mit 600 µl TAP-Arg über Nacht in 24-Well Platten regeneriert und am nächsten Tag auf TAP-Paro (10 µg/ml Paromomycin) ausplattiert. Nach 10 Tagen wurden Kolonien sichtbar und die Anzahl der Kolonien ausgezählt.

2.3.2 Geninaktivierungen durch Elektroporation von ZFN-Plasmiden

In dieser Arbeit wurden ZFN-Plasmide gegen die Gene *ChR1*, *ChR2* und *COP1/2* verwendet (Tabelle 13, Sizova *et al.* 2013 Greiner *et al.* 2017). Die Elektroporation erfolgte laut vorherigem Abschnitt. Jeweils 50 ml des Stammes CC-3403 wurden in TAP-Arg unter synchronisierten Lichtbedingungen (14 h Licht bei 25 °C, 10 h Dunkelheit bei 18 °C) für 7-10 Tage durch regelmäßiges Verdünnen im logarithmischen Wachstum gehalten. Am Tag der Transformation wurden die Zellen eine Stunde vor dem Wechsel von der Licht- in die

Dunkelphase bei 1500 g für 10 min pelletiert und auf 1×10^8 Zellen/ml in TAP-Suc (40 mM Saccharose) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend für 30 min im Heizblock bei 40 °C inkubiert. 40 µl Zellen (4×10^6 Zellen) wurden mit je 1 µg der zwei ZFN-Plasmide, 2 µg des Donor-Plasmids oder 20 pmol des Donor-ODNs und 0,5 µg des Selektionsplasmids (pArg) vermischt und laut Tabelle 23 in einer 400 µl Küvette (Spaltbreite 2 mm) elektroporiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Plasmide für jede Transformation sind in Tabelle 19 aufgeführt. Die transformierten Zellen wurden mit 600 µl TAP über Nacht in 24-Well Platten regeneriert und am nächsten Tag auf TAP-Platten ausplattiert. Nach 10 Tagen wurden je Transformationsbedingung 96 Arginin-prototrophe-Stämme gepickt und mit einer FLAG-PCR (Tabelle 26) analysiert.

Tabelle 19: Transformationsbedingungen mit ZFN-Plasmiden

Transformation	Abb.	Stamm	ZFN-Plasmid	Donor-DNA	Selektionsplasmid
aphVIII-Reparatur	Abb. 3.2	ZF37, a, b, c, d	p216 2 µg, p217 2 µg	p183 2 µg	-
ChR1-ZFN – 2600	Abb. 3.3	CC-3403	p216 1 µg, p217 1 µg	p005 2 µg	p230 0,5 µg
ChR2-ZFN – 2800	Abb. 3.3	CC-3403	p218 1 µg, p219 1 µg	p282 2 µg	p230 0,5 µg
- 500	Abb. 3.3	CC-3403	p218 1 µg, p219 1 µg	p313 2 µg	p230 0,5 µg
- ODN Fw	Abb. 3.3	CC-3403	p218 1 µg, p219 1 µg	1190 20 pmol	p230 0,5 µg
- ODN ds	Abb. 3.3	CC-3403	p218 1 µg, p219 1 µg	1190 20 pmol 1191 20 pmol	p230 0,5 µg
- ODN FW PTO	Abb. 3.3	CC-3403	p218 1 µg, p219 1 µg	1192 20 pmol	p230 0,5 µg
- ODN ds PTO	Abb. 3.3	CC-3403	p218 1 µg, p219 1 µg	1192 20 pmol 1193 20 pmol	p230 0,5 µg
- ohne Donor	Abb. 3.3	CC-3403	p218 1 µg, p219 1 µg	-	p230 0,5 µg
COPI/2-ZFN #1 – 500	Abb. 3.3	CC-3403	p314 1 µg, p315 1 µg	p309 2 µg	p230 0,5 µg
- ODN FW+RV PTO	Abb. 3.3	CC-3403	p314 1 µg, p315 1 µg	1206 20 pmol 1207 20 pmol	p230 0,5 µg
#2 – 500	Abb. 3.3	CC-3403	p316 1 µg, p317 1 µg	p310 2 µg	p230 0,5 µg
#3 – 500	Abb. 3.3	CC-3403	p318 1 µg, p319 1 µg	p312 2 µg	p230 0,5 µg

2.3.3 Geninaktivierungen mit Cas9-RNPs

Herstellung der Cas9-RNP-Komplexe

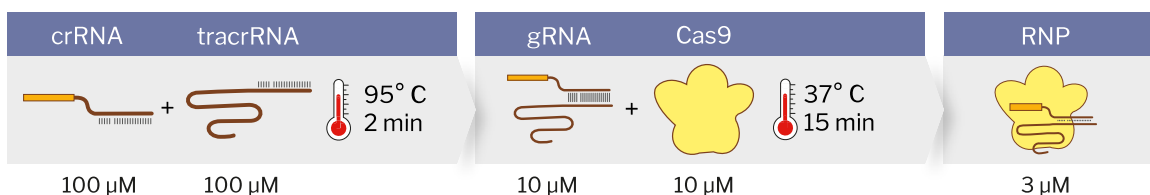


Abbildung 2.6: Herstellung der Cas9-gRNA Ribonukleoprotein-Komplexe

RNP-Komplexe wurden frisch zubereitet und maximal einige Tage bei 4 °C gelagert (Abbildung 2.6). Cas9-Protein und RNAs wurden stets auf Eis gekühlt und es wurde in einer

RNase-freien Umgebung gearbeitet. Für jedes Experiment – ein Zielgen in einem Stamm – wurden 20 µl (60 pmol) Cas9-RNP-Komplex hergestellt. Rekombinantes Cas9- bzw. Cas12a-Protein wurde im Labor aufgereinigt (Kapitel 2.2.4) und für jedes Experiment wurde ein frisches Aliquot (10 µM Cas9-Protein in Puffer O) auf Eis aufgetaut. Die tracrRNA und die crRNAs wurden synthetisch hergestellt und in 100 µM IDTE Puffer gelöst (Kapitel 2.2.5).

Zuerst wurden die tracrRNA und die crRNA in äquimolaren Mengen in DUPLEX-Puffer in einer finalen Konzentration von je 10 µM vermischt und durch zweiminütiges Erhitzen auf 95 °C mit anschließendem langsamem Abkühlen (0,1 °C/s) zu einer funktionellen gRNA verbunden (Tabelle 20).

Die gRNA wurde mit Cas9-Protein in äquimolarem Verhältnis in Puffer O vermischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert, wodurch sich der funktionelle Cas9-RNP-Komplex bildete (Tabelle 20). Der RNP-Komplex wurde bis zur Verwendung auf Eis oder bei 4 °C gelagert.

Tabelle 20: Formation des Cas9-gRNA Komplex

i) tracrRNA:crRNA → gRNA		finale Konz.	Inkubation	
tracrRNA (100 µM)	1 µl	10 µM	95 °C	2 min
crRNA (100 µM)	1 µl	10 µM	20 °C	Rate: 0,1 °C/s
DUPLEX Puffer	8 µl		4 °C	∞
Gesamtvolumen	10 µl		Gesamt	ca. 15 min

ii) Cas9:gRNA → RNP				Inkubation	
gRNA aus i) (10 µM)	9 µl	3 µM			
SpCas9 (10 µM ≈ 1,6 µg/µl)	9 µl	3 µM			
Buffer O (10 x)	3 µl	1 x	37 °C	15 min	
H ₂ O	9 µl		4 °C	∞	
Gesamtvolumen	30 µl				

Elektroporation von Cas9-RNPs in *C. reinhardtii*-Zellen

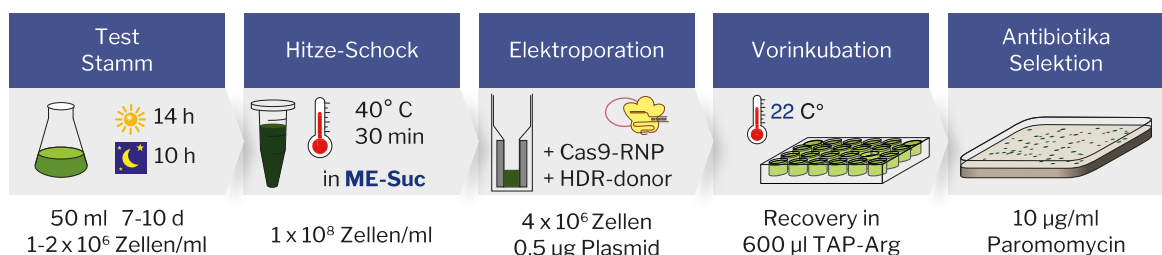


Abbildung 2.7: Elektroporation von *C. reinhardtii*-Zellen mit Cas9-RNPs

C. reinhardtii-Zellen wurden in TAP(±Arg)-Medium, bei 110 U/min unter synchronisierenden Wachstumsbedingungen, d.h. abwechselnden Licht- und Temperaturzyklen, kultiviert (14 h Licht mit 5-8 W/m² bei 25 °C und 10 h Dunkelheit bei 18 °C). Die Zellen wurden für 7-10 Tage in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten (0,5 - 5 x 10⁶ Zellen/ml), indem die Kultur alle 2-3 Tage mit frischem TAP-Medium verdünnt

wurde. Am Transformationstag erreichte die Zelldichte $1 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml. Für ein Experiment (1 Zielgen in 1 Stamm) wurden $\sim 2,5 \times 10^7$ Zellen verwendet.

Die Zellen wurden 1-2 Stunden vor dem Wechsel von der Licht- in die Dunkelphase bei 1500 g (Stämme mit Zellwand bei 2500 g) für 10 min bei RT pelletiert und in ME-Suc-Puffer in einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Die konzentrierte Zellsuspension wurde in Aliquots von 500 μ l in 2 ml Reaktionsgefäßen einem Hitzeschock von 40 °C für 30 min bei 350 rpm in einem Thermoblock unterzogen und für weitere 30 min bei RT regeneriert.

Pro Elektroporation wurden üblicherweise 38 μ l der Zellsuspension ($3,8 \times 10^6$ Zellen) mit 0,3 - 0,5 μ g Selektionsplasmid, 1-2 μ g Donorplasmid oder 20 pmol Donor-ODNs und 3-4 μ l (9-12 pmol) Cas9-RNP vermischt. Die genauen Elektroporationsbedingungen für jedes Zielgen sind in Tabelle 22 zu finden.

Tabelle 21: Transformationsansatz zur Elektroporation

Komponente	Menge / Ansatz	Konzentration	Volumen
Markerplasmid (1 μ g/ μ l)	0,5 μ g	11,5 ng/ μ l	0,5 μ l
FLAG-Donor-ODN (10 μ M)	20 pmol	0,46 μ M	2 μ l
Cas9:gRNA RNP (3 μ M)	9 (-12) pmol	0,21 (-0,27) μ M	3 (-4) μ l
Zellen (1×10^8 Zellen/ml)	$3,8 \times 10^6$ Zellen	$0,87 \times 10^8$ Zellen/ml	38 μ l
		Gesamt	43,5 μ l

Meist wurde ein Ansatz für 3-5 Elektroporationen vorgemischt. Von dieser Zell-DNA-RNP-Suspension wurden 40 μ l in 400 μ l Küvetten (Spaltbreite 2 mm) überführt. Der Widerstand der Zell-DNA-RNP-Suspension wurde überprüft und sollte zwischen 400-550 Ω liegen. Falls der Wert kleiner als 350 Ω war, wurde das Volumen der Zell-DNA-RNP-Suspension um 3-5 μ l auf 35-37 μ l verringert. Ein höherer Widerstand wurde durch Zugabe von 0,5-1,5 μ l Cas9-RNP ausgeglichen werden. Anschließend wurden die Zellen laut den Einstellungen in Tabelle 23 mit einem NEPA21 Elektroporator transformiert. Mit 600 μ l frischem TAP-Medium wurden die elektroporierten Zellen aus der Küvette gewaschen und in ein Well einer 48-Mikrotiterplatte überführt.

Die Mikrotiterplatte wurde bei 110 rpm über Nacht bei Dauerlicht inkubiert und am nächsten Tag wurden die 600 μ l Zellen eines Wells auf eine quadratische Platte (12 cm) mit TAP-Agar und entsprechender Selektion (Tabelle 5) ausplattiert.

Tabelle 22: Transformationsbedingungen mit Cas9-RNPs

P = PAGE purified, „~“ = Menge wurde variiert, „-“ = nicht verwendet

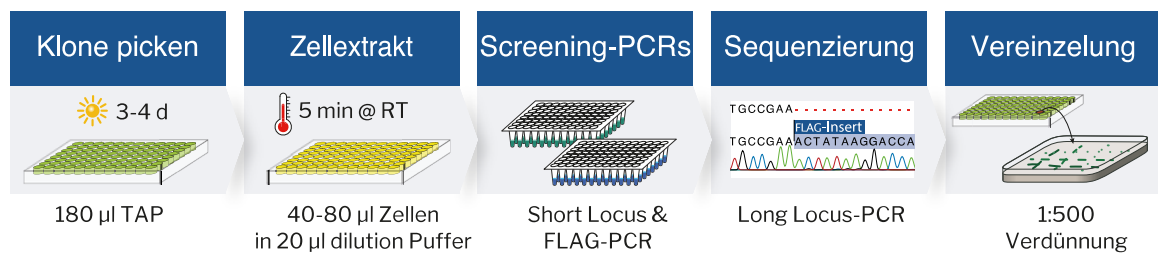
Stamm	Nuklease:gRNA	Donor-DNA	Selektionsplasmid	Trafo ID	
aphVIII*-Reparatur (Abb. 3.6)					
Teststamm „d“					
- TAP(-Suc)/ ME(-Suc)	<i>SpCas9</i> :r011 6 pmol	p183 2 µg	-	Trafo D (2016)	
- PCR 500		Δ <i>aphVIII</i> 500	-	Trafo H (2017)	
- Oligo ds		ds 1313+1314 5 pmol	-	Trafo H (2017)	
- Oligo nicht-PAM		1314 10 pmol	-	Trafo H (2017)	
- Oligo PAM 60		1313 10 pmol	-	Trafo H (2017)	
- Oligo PAM 100		„100 ss“ 10 pmol	-	Trafo H (2017)	
Donor-Vergleich (Abb. 3.7)					
<i>COP1/2</i> (CC-3403)					
- keine Donor-DNA	<i>SpCas9</i> :r007 6 pmol	-	pARG7 0,5 µg	Trafo D3 (2016)	
- Plasmid 500	<i>SpCas9</i> :r007 12 pmol	p309 2 µg	pARG7 0,5 µg	Trafo K14 (2018)	
- ss nicht-PAM	<i>SpCas9</i> :r007 12 pmol	1320 10 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo J (2017)	
- ss PAM	<i>SpCas9</i> :r007 12 pmol	1321 10 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo J (2017)	
- ODN Fw+Rv	<i>SpCas9</i> :r007 12 pmol	1206/07 20 pmol	pARG7 0,5 µg	Trafo K13 (2018)	
- teilw. ds ODN	<i>SpCas9</i> :r007 12 pmol	ds 1322/23 5 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo J (2017)	
- ds ODN	<i>SpCas9</i> :r007 12 pmol	ds 1320/21 ^P 5 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo J (2017)	
Gen-KOs (Abb. 3.8)					
<i>COP1/2</i>	siehe Abb.3.7				
<i>ChR1</i>	SAG11-32b CC-3403	<i>SpCas9</i> :084 12 pmol	ds 1974+1975 40 pmol	pAPHVIII 0,5 µg pARG7 0,5 µg	Trafo M1 (2018) Trafo M6 (2018)
<i>ChR2</i>	SAG11-32b CC-3403	<i>SpCas9</i> :108 12 pmol	ds 1998+1999 40 pmol	pAPHVIII 0,5 µg pARG7 0,5 µg	Trafo M3 (2018) Trafo M7 (2018)
<i>COP5</i> -a	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r010	1472 + 1473	pARG7	Irina Sizova
-b	CC-3403 CC-125	<i>SpCas9</i> :r009	1474 + 1475	pARG7 pAPHVII	Irina Sizova (Greiner 2017)
<i>COP6</i>	CC-125	<i>SpCas9</i> :r097 12 pmol	ds 1796+1797 20 pmol	pAPHVIII 1 µg	Trafo D2 (2018)
<i>COP7</i>	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r086 12 pmol	ds 1717+1718 20 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo W5 (2017)
<i>COP8</i>	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r087 12 pmol	ds 1717+1718 20 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo W7 (2017)
<i>COP11/12</i>	CC-125	<i>SpCas9</i> :r088 12 pmol	ds 1796+1797 20 pmol	pAPHVII 0,5 µg	Trafo B (2018)
aCRY	SAG 73.72	<i>SpCas9</i> :r019 12 pmol	1302+1303 20 pmol	pAPHVIII 0,4 µg	Trafo WB3 (2017)
<i>PHOT</i> (Schwachlicht)	SAG11-32b Δ <i>uvr8</i>	<i>SpCas9</i> :r024 12 pmol	1796+1797 20 pmol p351 2 µg	pAPHVIII 1 µg pAPHVIII 0,8 µg	Trafo G4 (2018) Trafo N,O (2017)
<i>UVR8</i> -a	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r015 7,5 pmol	ds 1214+1215 12 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo I7 (2016)
-b	CC-3403 CC-125	<i>SpCas9</i> :r014 7,5 pmol <i>SpCas9</i> :r014 12 pmol	ds 1216+1217 12 pmol ds 1796+1797 20 pmol	pARG7 0,3 µg pAPHVIII 0,5 µg pAPHVIII 1 µg	Trafo I8(2016) Trafo A1 (2018) Trafo C2 (2018)
<i>ARG7</i>	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r072 12 pmol	ds 1613+1614 20 pmol	-	Trafo A (2018)
<i>RBP40</i> -a	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r017 12 pmol	ds 1247+1248 20 pmol	pARG7 0,5 µg	Trafo G1 (2017)
-b	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r018 12 pmol	ds 1249+1250 20 pmol	pARG7 0,5 µg	Trafo G2 (2017)
-c	CC-3403 CC-4533	<i>SpCas9</i> :r090 12 pmol	ds 1719+1720 20 pmol	pARG7 0,3 µg pAPHVIII 0,3 µg	Trafo W1 (2017) Trafo Ω19 (2017)

	Stamm	Nuklease:gRNA	Donor-DNA	Selektionsplasmid	Trafo ID
-d	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r091 12 pmol	ds 1721+1722 20 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo W3 (2017)
<i>PBCP</i> -a	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r054 12 pmol	ds 1490+1491 30 pmol	pAPHVII 0,5 µg	Trafo FF1 (2017)
-b	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r055 12 pmol	ds 1492+1493 30 pmol	pAPHVII 0,5 µg	Trafo FF2 (2017)
<i>PBCP-LIKE</i> -a	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r044 12 pmol	p358 1,5 µg	pARG7 0,3 µg	Trafo FB2 (2017)
-b	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r045 12 pmol	ds 1397+1398 10 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo FA3 (2017)
<i>SNRK2.2</i> -a	siehe Abb. 3.11				
-b	CC-125	<i>SpCas9</i> :r034 10,5 pmol	ds 1501+1502 20 pmol	pAPHVIII 1 µg	Trafo N2 (2019)
<i>PSR1</i>	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r067 9 pmol	ds 1559+1560 20 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo Q1 (2017)
<i>2-LOG</i> -a	CC-125	<i>SpCas9</i> :r100 12 pmol <i>SpCas9</i> :r100 9 pmol	ds 1796+1797 20 pmol	pAPHVIII 1 µg	Trafo G1 (2018) Trafo H5 (2018)
-b	CC-125	<i>SpCas9</i> :r101 12 pmol <i>SpCas9</i> :r101 9 pmol	ds 1796+1797 20 pmol	pAPHVIII 1 µg	Trafo G2 (2018) Trafo G6 (2018)
<i>4-IPT</i> -a	CC-125	<i>SpCas9</i> :r166 10,5 pmol	ds 2254+2255 20 pmol	pAPHVIII 0,5 µg	Trafo FK5 (2019)
-b	CC-125	<i>SpCas9</i> :r162 10,5 pmol	ds 1945+1946 20 pmol	pAPHVIII 0,5 µg	Trafo FK6 (2019)
<i>CAV2</i> -a	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r144 12 pmol	ds 1945+1946 20 pmol	pARG7 0,5 µg	Trafo GN5 (2018)
-b	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r145 10,5 pmol	ds 1945+1946 20 pmol	pARG7 0,5 µg	Trafo GN5 (2018)
<i>CiliK</i> -a	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r138 12 pmol	ds 1974+1975 20 pmol	pARG7 0,5 µg	Trafo GN5 (2018)
-b	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r139 13,5 pmol	ds 1939+1940 20 pmol	pARG7 0,5 µg	Trafo GN5 (2018)
Protein-Tags (Abb. 3.9)					
<i>COP1/2 -mVenus</i>	CC-125	<i>SpCas9</i> :r064 9 pmol	p368 1,5 µg	pAPHVII 0,25 µg	Trafo EH1 (2017)
-SNAP	CC-125	<i>SpCas9</i> :r064 9 pmol	p369 1,5 µg	pAPHVII 0,25 µg	Trafo EH3 (2017)
<i>ChR2</i> -SNAP	CC-125	<i>SpCas9</i> :r071 9 pmol	p370 1,5 µg	pAPHVII 0,25 µg	Trafo EH4 (2017)
Protokoll-Optimierung (Abb. 3.10)					
- Synchronisat.	CC-125	<i>SpCas9</i> :r105 12 pmol	ds 1796+1797 20 pmol	pAPHVIII 1 µg	Trafo D (2018)
- Hitze-Schock	CC-125	<i>SpCas9</i> :r032 12 pmol	ds 1796+1797 20 pmol	pAPHVIII 1 µg	Trafo C (2018)
- Elektroporat.	CC-125	<i>SpCas9</i> :r032 12 pmol	ds 1796+1797 20 pmol	pAPHVIII 1 µg	Trafo C (2018)
- RNP-Konz.	CC-125	<i>SpCas9</i> :r032 □	ds 1476+1477 20 pmol	pAPHVIII 0,3 µg	Trafo V (2017)
- ODN-Konz.	CC-125	<i>SpCas9</i> :r032 12 pmol	ds 1476+1477 □	pAPHVIII 0,3 µg	Trafo Ω (2017)
- Marker-Konz.	CC-125	<i>SpCas9</i> :r032 12 pmol	ds 1796+1797 20 pmol	pAPHVII □	Trafo ¥ (2017)
HDR-Vergleich (Abb. 3.11)					
- CC-3403	CC-3403	<i>SpCas9</i> :r032 9 pmol	1476+1477 20 pmol	pARG7 0,3 µg	Trafo Q (2017)
- CC-4350	CC-4350	<i>SpCas9</i> :r032 12 pmol	1476+1477 20 pmol	pAPHVIII 0,3 µg	Trafo T8 (2018)
- CC-4533	CC-4533	<i>SpCas9</i> :r032 12 pmol	1476+1477 20 pmol	pAPHVIII 0,3 µg	Trafo U11 (2018)
- CC-125	CC-125	<i>SpCas9</i> :r032 15 pmol	1476+1477 20 pmol	pAPHVIII 0,25 µg	Trafo R2 (2017)
		<i>SpCas9</i> :r032 12 pmol	1476+1477 20 pmol	pAPHVIII 0,3 µg	Trafo Ω (2017)
		<i>SpCas9</i> :r032 12 pmol	1476+1477 20 pmol	pAPHVIII 0,3 µg	Trafo U (2018)

Tabelle 23: ElektroporationsbedingungenOptimierte Pulseinstellungen für verschiedene *C. reinhardtii*-Stämme mit dem NEPA21 Elektroporator.

Stamm	Zellwand	Spannung	Pulslänge	Intervall	Pulsanzahl	Abfallrate	Polarität
1. Poring-Puls							
CC-48	intakt	300 V	8 ms	50 ms	1	40 %	+
CC-125	intakt	300 V	8 ms	50 ms	1	40 %	+
CC-1010	intakt	300 V	8 ms	50 ms	1	40 %	+
CC-1826	intakt	300 V	8 ms	50 ms	1	40 %	+
CC-3403	defekt	200 V	8 ms	50 ms	2	40 %	+
CC-4350	defekt	200 V	8 ms	50 ms	2	40 %	+
CC-4533	defekt	200 V	8 ms	50 ms	2	40 %	+
SAG11-32b	intakt	300 V	12 ms	50 ms	1	40 %	+
SAG73.72	intakt	300 V	10 ms	50 ms	1	40 %	+
2. Transfer-Pulse (identisch für alle Stämme)							
Alle Stämme		20 V	50 ms	50 ms	5	40 %	+/-

2.3.4 Screening von *C. reinhardtii*-Mutanten

**Abbildung 2.8: Ablauf der Klonanalyse**

Für jede Transformationsbedingung wurden je 96 Einzelkolonien analysiert. Dazu wurden die Klone in 180 µl TAP-Medium einer 96-Well-Zellkulturplatte überführt und unter Dauerlicht (3-6 W/m²) ohne Schütteln für 3-4 Tage inkubiert, bis die Zellsuspensionen in allen Wells die gleiche Dichte erreichte.

Herstellung eines *C. reinhardtii* Zellextrakts

C. reinhardtii Zellextrakte zur Analyse der genomischen DNA durch Kolonie-PCRs wurden im 96-Well-Format hergestellt. Dazu wurden die Zellen gemischt und 80 µl Zellen (bzw. 40 µl für Stämme mit defekter Zellwand) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit V-Boden transferiert. Die Zellen wurden pelletiert (2500 g x 10 min, RT), der Überstand ausgeschüttet und die verbleibenden Tropfen mit einem frischen Papiertuch aufgesaugt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die Zellpellets wurden in 20 µl Verdünnungspuffer (Teil des *Phire Plant PCR Kits*) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die verbleibenden Zellen und Zellreste wurden durch Zentrifugation (2500 g x 10 min) pelletiert. Die im Überstand enthaltene genomische DNA kann als Template für PCRs verwendet werden (1 µl Überstand für eine 10 µl PCR-Reaktion). Die Zellextrakte wurden bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert und vor jedem Gebrauch zentrifugiert (2500 g x 10 min, RT).

Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden die Überstände von den Pellets getrennt und in eine frische 96-V-Mikrotiterplatte überführt und bei -20°C gelagert.

C. reinhardtii Kolonie-Screening-PCRs

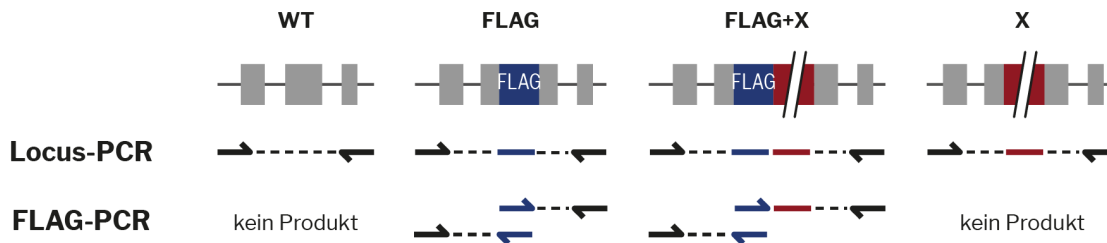


Abbildung 2.9: Screening-PCRs

Potenzielle Mutanten wurden mit zwei PCR-Typen auf Genveränderungen untersucht, der „kurzen Locus-PCR“ und der „FLAG-PCR“ (Abbildung 2.9, Kapitel 3.1.3). Die Analyse fand im 96-Well-PCR-Format statt. Auf Basis der *Phire Plant* Polymerase wurde ein PCR-Mix erstellt (Tabelle 24) und je 9 µl in ein Well einer 96-PCR-Platte pipettiert. In jedes Well wurde 1 µl des Zellextrakts gegeben und die PCR in einem Thermocycler inkubiert (Tabelle 24). Die PCR-Produkte wurden in einem TBE-Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt.

Tabelle 24: Screening-PCR

PCR-Angaben für eine „kurze Locus-PCR“ oder eine „FLAG-PCR“. (Primer FW + RV= kurze Locus-Primer oder FLAG-Primer, für Details siehe Tabelle 26.)

Komponente	Vol.	Konz.	PCR-Cycling		
Phire Plant MM (2x)	500 µl	1x	Denaturierung	98 °C	5 min
Primer FW (100 µM)	5 µl	0,5 µM	Denaturierung	98 °C	8 s
Primer RV (100 µM)	5 µl	0,5 µM	Hybridisierung	±65 °C	8 s
Betaine (5 M)	200 µl	1 M	Elongation	72 °C	40 s
H ₂ O	190 µl		Elongation	72 °C	2 min
	Vol. 900 µl		Lagerung	8 °C	∞
	(96x 9 µl)				
+ DNA (Zellextrakt)	96x 1 µl				
	Vol. 96x 10 µl				

Bei einer kurzen Locus-PCR wurden Mutanten ausgewählt, deren PCR-Bandenmuster sich vom WT unterschieden (Abbildung 2.10). Potenzielle Klone wurden erneut mit einer „langen Locus-PCR“ analysiert und sequenziert (Tabelle 25). Die Sequenzanalysen fanden mit *CLC Main Workbench* (Quiagen) statt.

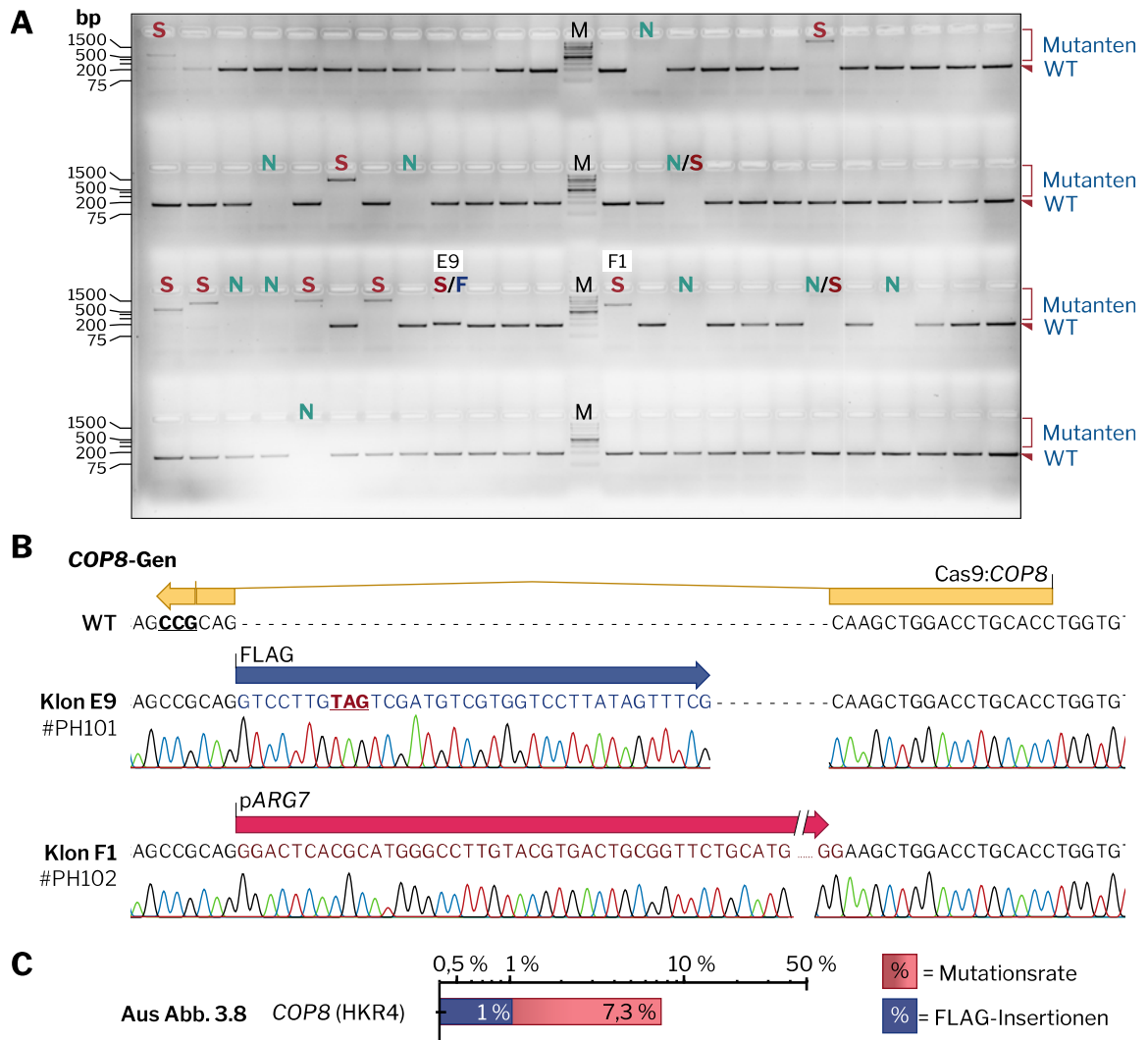


Abbildung 2.10: Identifikation von Mutanten durch die kurze Locus-PCR

A) Genomische Analyse von 96 zufällig gepickten Arg⁺-Klonen, die mit dem Cas9:r87(*COP8.1*)-Komplex transformiert wurden (Abbildung 3.8, *COP8*). Klone wurden mit den Primern 1769+1770 auf Veränderungen im *COP8*-Gen mit der kurzen Locus-PCR (Tabelle 24) untersucht (WT: 198 bp). Verschobene Banden (9 x **S**) deuten auf eine Insertion hin. Kleine Verschiebungen (1 x **S/F**, 234 bp) deuten auf die Integration des FLAG-Donors hin. Fehlende Banden (**N**) resultieren von einer fehlerhaften PCR oder durch sehr große Insertionen im Zielgen, die eine effiziente Amplifikation verhinderten. M = DNA-Marker. **B)** Genomische Bereiche von Klonen mit auffälligem Bandenmuster wurden erneut per „langer Locus“-PCR (Tabelle 25) amplifiziert und sequenziert. Abgebildet ist die Sequenzanalyse der Klone E9 (Stamm PH101) und F1 (Stamm PH102). Cas9:*COP8* = Zielsequenz des Cas9-RNPs (r87). FLAG = FLAG-Donor-Sequenz (1717+1718). pARG7 = Zufällige Integration des ARG7-Selektionsplasmids (p230). **C)** Auszug aus Abbildung 3.8 mit der finalen Mutationsrate. Bei 7 der potenziellen Klone aus A) ließen sich Mutationen im *COP8*-Gen durch Sequenzierung nachweisen.

Die FLAG-PCR liefert eine PCR-Bande, wenn die FLAG-Sequenz an der Zielsequenz inseriert wurde (Kapitel 3.1.3, Abbildung 2.11).

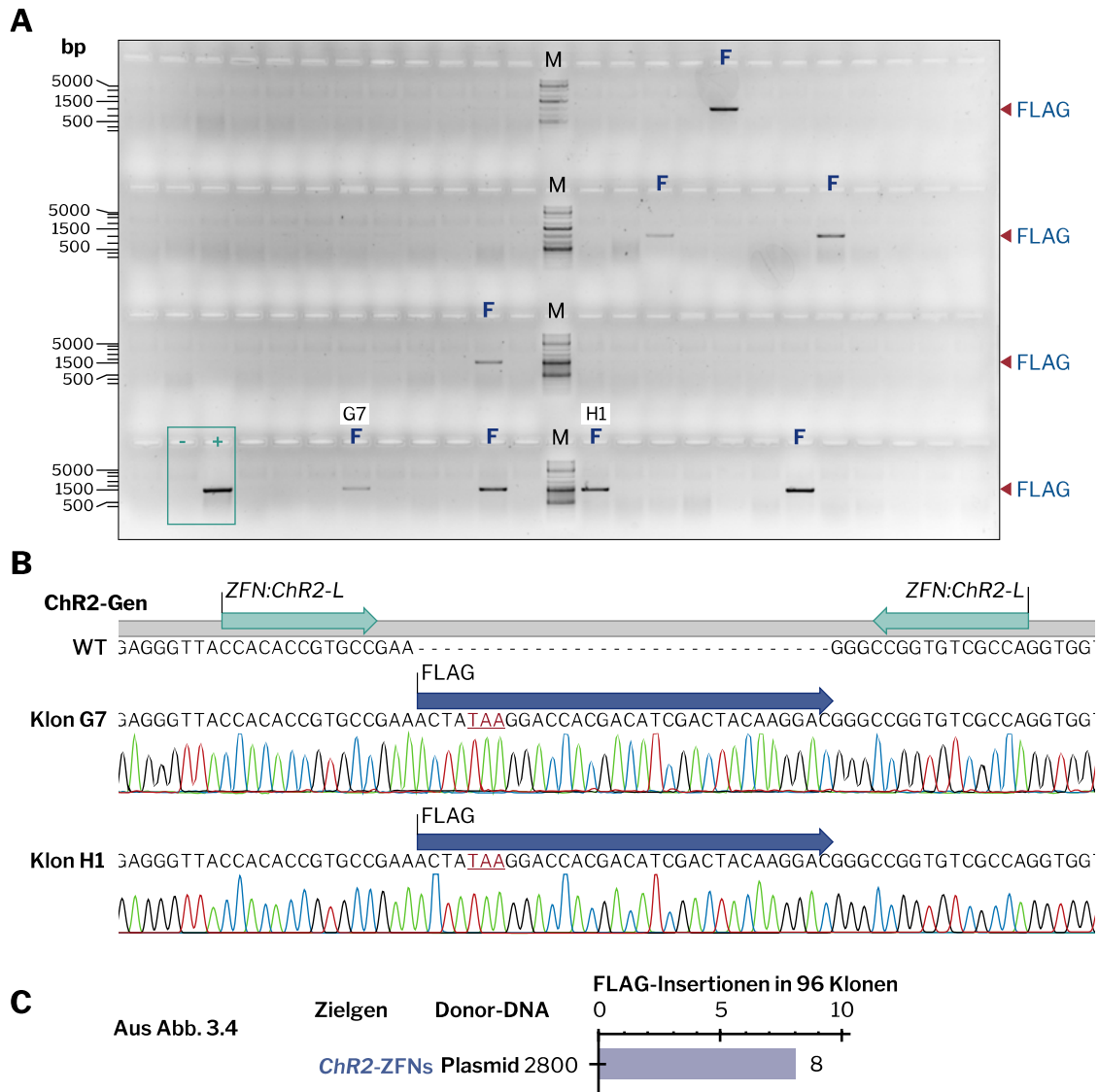


Abbildung 2.11: Identifikation von Mutanten durch die FLAG-PCR.

A) Genomische Analyse von 94 zufällig gepickten Arg⁺-Klonen, die mit *ChR2*-ZFN-Plasmiden transformiert wurden (Abbildung 3.4, *ChR2*-ZFNs Plasmid 2800). Klone wurden mit dem Locus-Primer 1159 und dem FLAG-Primer 1163 untersucht (Tabelle 24). Die Anwesenheit einer Bande (**F**, 986 bp) deutet auf die Insertion der FLAG-Sequenz im *ChR2*-Gen hin. M = DNA-Marker; - = Negativ-Kontrolle (WT-DNA); + = Positiv-Kontrolle **B)** Genomische Bereiche der Klone, die eine FLAG-Bande zeigten, wurden erneut per „langer Locus“-PCR (Tabelle 25) amplifiziert und sequenziert. Abgebildet ist die Sequenzanalyse der Klone G7 und H1. ZFN:ChR2-L/R = Zielsequenz der linken und rechten *ChR2*-ZFN-Bindedomäne. FLAG = FLAG-Donor-Sequenz (p282). **C)** Auszug aus Abbildung 3.4 mit der resultierenden FLAG-Insertionsrate.

Tabelle 25: Sequenzier-PCR

PCR-Angaben für 8 Reaktionen (je 25 µl) einer langen Locus-PCR. Details der verwendeten Primer sind in Tabelle 26 aufgeführt.

Komponente	Vol.	Konz.	PCR-Cycling		
Phire Plant MM (2x)	100 µl	1x	Denaturierung	98 °C	5 min
Primer FW (100 µM)	1 µl	0,5 µM	Denaturierung	98 °C	12 s
Primer RV (100 µM)	1 µl	0,5 µM	Hybridisierung	±65 °C	12 s
Betaine (5 M)	40 µl	1 M	Elongation	72 °C	200 s
H ₂ O	78 µl		Elongation	72 °C	2 min
	Vol. 180 µl		Lagerung	8 °C	∞
	(8x 22,5 µl)				
+ DNA (Zellextrakt)	8x 2,5 µl				
	Vol. 8x 25 µl				

Tabelle 26: Verwendete Primer zum Screenen und Sequenzieren von Mutanten

FLAG-Primer sind unterstrichen. *nv* = nicht verwendet

Zielgen	Verwendung	Screening-Primer (kurze Locus-PCR)	FLAG Primer	Sequenzier-Primer (lange Locus-PCR)
<i>aphVIII*</i> - Testkassette	Abb. 3.2, 3.6	<i>nv</i>	<i>nv</i>	1050+1051
<i>COP1/2</i> - ZFN #1	Abb. 3.4, 3.12	1153+1197	1148+ <u>1143</u>	1148+1199/1134
- ZFN #2	Abb. 3.4	<i>nv</i>	1157+ <u>1143</u>	1153+1136
- ZFN #3	Abb. 3.4	<i>nv</i>	1131+ <u>1143</u>	1133+1202
- a (<i>SpCas9</i> :r07)	Abb. 3.3, 3.7, 3.8, 3.12	1153+1197	FLAG-FW: <u>1231</u> +1199 FLAG-RV: 1148+ <u>1143</u>	1148+1199/1134
- b (<i>SpCas9</i> :r64)	Abb. 3.9	1360+1607	<i>mVenus</i> : <u>1671</u> +1723 SNAP: <u>1669</u> +1607	1360+1723
<i>ChR1</i> - ZFN	Abb. 3.4	1169+1170	<u>1163</u> +1166	1166+1168
- <i>SpCas9</i> :r84	Abb. 3.8	1677+1682	<i>nv</i>	1680+1684
<i>ChR2</i> - ZFN	Abb. 3.4	<i>nv</i>	1159+ <u>1163</u>	1159+1161
-a (<i>SpCas9</i> :r108)	Abb. 3.8	2002+1953	<i>nv</i>	2004+2005
-b (<i>SpCas9</i> :r71)	Abb. 3.9	1608+1609	<u>1669</u> +1609	1608+1609
<i>COP5</i>	Abb. 3.8	1275+1276	<u>1218</u> / <u>1219</u>	1300+1301
<i>COP6</i>	Abb. 3.8	1869+1871	<u>1783</u> +1872	1867+1872
<i>COP7</i>	Abb. 3.8	1759+1760	1759+1760+ <u>1218</u>	<i>nv</i>
<i>COP8</i>	Abb. 3.8	1769+1770	1769+ <u>1218</u> + <u>1219</u>	1765+1766
<i>COP11/12</i>	Abb. 3.8	1775+1776	<i>nv</i>	1773+1774
<i>aCRY</i>	Abb. 3.8	1309+1312	1308+ <u>1219</u>	1308+1312
<i>PHOT</i>	Abb. 3.8	1255+1256	FLAG-FW: 1253+ <u>1218</u> FLAG-RV: 1257+ <u>1219</u>	1257+1253
<i>UVR8</i> - a	Abb. 3.8	<i>nv</i>	FLAG-FW: <u>1163</u> +1226 FLAG-RV: <u>1219</u> +1222	1221+1226
- b	Abb. 3.8	<i>nv</i>	FLAG-FW: <u>1165</u> +1225 FLAG-RV: <u>1219</u> +1224	1225+1224
<i>ARG7</i>	Abb. 3.8	1619+1621	<i>nv</i>	<i>nv</i>

Zielgen	Verwendung	Screening-Primer (kurze Locus-PCR)	FLAG Primer	Sequenzier-Primer (lange Locus-PCR)
<i>RBP40</i>	- a	Abb. 3.8	1240+1236	1240+1236+ <u>1218</u> + <u>1219</u> <i>nv</i>
	- b	Abb. 3.8	1242+1246	FLAG-FW: 1246+ <u>1218</u> FLAG-RV: 1242+ <u>1219</u> <i>nv</i>
	- c	Abb. 3.8	1240+1237	1237+ <u>1218</u> <i>nv</i>
	- d	Abb. 3.8	1242+1246	1246+ <u>1218</u> <i>nv</i>
<i>PBCP</i>	- a	Abb. 3.8	1402+1403	FLAG-FW: 1407+ <u>1230</u> FLAG-RV: 1400+ <u>1229</u> 1400+1407
	- b	Abb. 3.8	1406+1408	FLAG-FW: 1407+ <u>1230</u> FLAG-RV: 1400+ <u>1229</u> 1400+1407
<i>PBCP-LIKE</i>	- a	Abb. 3.8	1412+1414	<u>1230</u> +1416 1410+1416
	- b	Abb. 3.8	1418+1420	FLAG-FW: <u>1230</u> +1419 FLAG-RV: 1417+ <u>1144</u> 1417+1419
<i>SNRK2.2</i>	- a	Abb. 3.8, 3.10, 3.11	1713+1716	<i>nv</i> 1497+1500
	- b	Abb. 3.8	1753+1754	<i>nv</i> 1666+1667
<i>PSR1</i>	Abb. 3.8	1595+1596	<u>1610</u> +1593	1593+1601
<i>2-LOG</i>	- a	Abb. 3.8	1900+1902	<i>nv</i> 1897+1903
	- b	Abb. 3.8	1900+1902	<i>nv</i> 1897+1903
<i>4-IPT</i>	- a	Abb. 3.8	2214+1917	<i>nv</i> 2217+2218
	- b	Abb. 3.8	2214+1917	<i>nv</i> 2217+2218
<i>CAV2</i>	- a	Abb. 3.8	2032+2033	<u>1945</u> +2037 2036+2037
	- b	Abb. 3.8	2032+2033	<u>1945</u> +2037 2036+2037
<i>CiliK</i>	- a	Abb. 3.8	2022+2023	2028+ <u>1939</u> 2028+2029
	- b	Abb. 3.8	2022+2023	2028+ <u>1939</u> 2028+2029

Klone, in denen eine Mutation im Zielgen durch Sequenzierung identifiziert werden konnte, wurden durch einen Verdünnungsausstrich (200 µl einer 1:550 Verdünnung) vereinzelt und erneut sequenziert. Für jedes Gen wurden zwei Mutanten mit unterschiedlichen Mutationen in der laboreigenen Stammsammlung aufbewahrt, an Kooperationspartner weitergegeben oder dem *Chlamydomonas Ressource Center* zur Aufbewahrung und Weitergabe anvertraut (Tabelle 33).

Eine englische Version des Transformationsprotokolls wird demnächst in der Buchserie *Methods in Molecular Biology* erscheinen (Kelterborn *et al.* 2020).

2.4 Phototaxis-Assay

Die Phototaxis wurde in einem speziell angefertigten Lichtstreuapparat nach der Methode von Uhl & Hegemann (1990) und Berthold (2008) gemessen. Die Zellen wurden im Gameten-Zellstadium gemessen. Dazu wurden die Zellen 2 Tage vor den Experimenten zur Induktion der Gametogenese in NMM-Medium (80 mM MgSO₄, 100 mM CaCl₂, 3,1 mM K₂HPO₄ und 3,4 mM KH₂PO₄, pH 6,8) kultiviert. Infrarot-Messlicht wurde durch eine *C. reinhardtii* Zellsuspension (1 x 10⁵/ml) auf infrarotempfindliche Photodioden gestreut.

Der von der IR-Diode erzeugte Strom ist proportional zur Intensität des gestreuten Lichts. Zur Anregung der Algenzellen wurden LEDs mit 455 nm ($1,25 \times 10^{21}$ Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 530 nm ($8,68 \times 10^{20}$ Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) verwendet, die im rechten Winkel zum IR-Messlicht standen. Die Lichtintensitäten wurden mit Neutralglasfiltern eingestellt. Eine Ausrichtung der Algenpopulation zum LED-Licht, führte auch zu einer Änderung der Streuung und dient als Maß der Phototaxis.

Folgende weiterführende Tabellen sind im Anhang zu finden:

Tabelle 29: Gen-IDs der verwendeten <i>C. reinhardtii</i> -Gene	123
Tabelle 30: Liste der in dieser Arbeit generierten und verfügbaren Mutantenstämme	124
Tabelle 31: DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	126
Tabelle 32: Übersicht der verwendeten DNA-Plasmide	131
Tabelle 33: Zielsequenzen der verwendeten g RNAs.....	133



3 Ergebnisse

Ziel dieser Forschungsarbeit war die Etablierung einer Methode, um gezielt Gene im Kerngenom der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* zu inaktivieren oder zu modifizieren. Um gezielte Genveränderungen durchzuführen, wurden programmierbare Endonukleasen (in diesem Text synonym für Nukleasen) verwendet. In dieser Arbeit wurden zwei Typen programmierbarer Nukleasen angewendet: Zinkfingernukleasen (ZFNs) und Nukleasen des CRISPR-Systems.

Dieser Abschnitt wird wie folgt thematisch untergliedert: Zunächst wird die Optimierung der Zinkfingermethode erläutert, die die Anwendung von ZFNs auf motile Stämme ermöglicht hat, wodurch Einschränkungen früherer Experimente (Einleitung 1.3) überwunden werden konnten (Kapitel 3.1). Anschließend wird die Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems für *C. reinhardtii* beschrieben und anhand der Inaktivierung von 20 Genen die Flexibilität von CRISPR/Cas9 gegenüber ZFNs gezeigt (Kapitel 3.2). Zuletzt wird die „Blau-Grün“ Selektion in *C. reinhardtii* vorgestellt, welche eine weitere Protokolloptimierung erlaubt und besonders die Methode der präzisen Genmodifikationen verbessert, die auf Homologie-vermittelten Reparatursystemen (HDR) beruhen (Kapitel 3.3).

3.1 Geninaktivierung mittels Zinkfingernukleasen

3.1.1 Das *aphVIII*-Reparatursystem zum Testen von Nukleasen

Für die Etablierung neuer Nukleasen und die Optimierung entsprechender Transformationsbedingungen ist ein *in vivo*-Assay zur Überprüfung der Nukleaseaktivität notwendig. Dazu wurde das von Dr. Irina Sizova und Dr. Andre Greiner entwickelte *aphVIII*-Reparatursystem benutzt (Greiner 2014; Sizova *et al.* 2013). Hierbei wird getestet, ob die entsprechenden Nukleasen einen Doppelstrangbruch induzieren können, wodurch ein defekte Resistengen repariert wird. Neben dem Nachweis der Funktionalität *in vivo* erlaubt diese Methode die gleichzeitige Selektion potenzieller Klone, die u. U. eine Mutation im Zielgen aufweisen. Als Resistengen wird das *aphVIII*-Gen verwendet, das für die Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase Typ VIII codiert und eine Resistenz gegen das Antibiotikum Paromomycin vermittelt. Im Testsystem ist das *aphVIII*-Gen nach dem 620. Basenpaar (bp) durch eine 51 bp lange Insertion unterbrochen. Die inserierte Sequenz codiert für ein Stoppcodon, wodurch es zu einer frühzeitigen Translationstermination kommt, die in einer verkürzten unfunktionellen Variante des APHVIII resultiert. Diese inaktive Variante

wird im Folgenden als APHVIII* bezeichnet. Die Funktion kann nur dann wiederhergestellt werden, wenn die inserierte Sequenz durch die DNA-Reparatur im Rahmen der homologen Rekombination repariert wird. Dies erfordert die Zugabe einer Donor-DNA, mit der der DSB repariert werden soll. Im *aphVIII*-Testsystem findet die Reparatur nur dann effizient statt, wenn ein DNA-DSB in der 51 bp langen Insertion erfolgt, was beispielsweise durch eine programmierbare Nuklease verwirklicht werden kann. Da die inserierte Sequenz frei wählbar ist, können beliebige Nukleasen mit unterschiedlichen Zielsequenzen getestet werden.

Das Testsystem konnte bereits erfolgreich mit Zinkfingernukleasen in einem unmotilen Stamm angewendet werden (Sizova *et al.* 2013; Greiner 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde das Testsystem nun verwendet, um i) die Transformationseffizienz unter der Verwendung von ZFNs zu verbessern, damit auch motile *C. reinhardtii*-Stämme mutiert werden können, ii) neue ZFNs gegen *COP1/2* zu testen und iii) Transformationsbedingungen zu etablieren, die die Verwendung von CRISPR-Nukleasen ermöglichen.

Zur Vereinfachung des Austausches neuer Zielsequenzen in der *aphVIII**-Testkassette wurde ein Klonierungsplasmid entworfen, mit dem die neuen Zielsequenzen als Oligonukleotide in einer „Golden-Gate“-Klonierung eingefügt werden können (Methoden 2.2.2). Dabei kann neben der Zielsequenz der etablierten *ChR1*-ZFN eine neue zu testende Zielsequenz eingefügt werden (Abbildung 3.1 A+B). Zum Testen von Cas9-Nukleasen wurde eine 20 bp Zielsequenz im humanen *EMX1*-Gen gewählt, da Cas9 zusammen mit der hier bindenden Leit-RNA (gRNA) effizient Doppelstrangbrüche hervorruft (Ran *et al.* 2015).

Die neue *aphVIII**:*EMX1-ChR1* Testkassette beinhaltet neben dem mit der *EMX1*- und *ChR1*-Zielsequenz unterbrochenen *aphVIII*-Gen außerdem noch die in Fusion vorangesetzten Gene *ble* und *eyfp*. Das zweite Antibiotikaresistenzgen *ble* ist nötig, um die Testkassette in das Kerngenom von *C. reinhardtii* einzubringen. Der Fluoreszenzreporter *eyfp* dient der visuellen Bestätigung und Selektion von Klonen mit starker Expression der Testkassette. Zwischen dem *eyfp* und dem *aphVIII* ist ein fünffach GS-Linker eingefügt, der die Stabilität dieses dreiteiligen Fusionsproteins erhöht. Die Expression der Testkassette wird durch den starken konstitutiven Tandempromoter der *HSP70A*- und *RBCS2*-Gene, das *RBCS2*-Intron und den Terminator des *PSAD*-Gens kontrolliert (Abbildung 3.1 C; Sizova *et al.* 2013, Greiner *et al.* 2014).

Damit kann die *aphVIII-*EMX1-ChR1* Testkassette verwendet werden, um die *ChR1*-ZFNs direkt mit der *EMX1*-Cas9-gRNA zu vergleichen (Kapitel 3.2.1).**

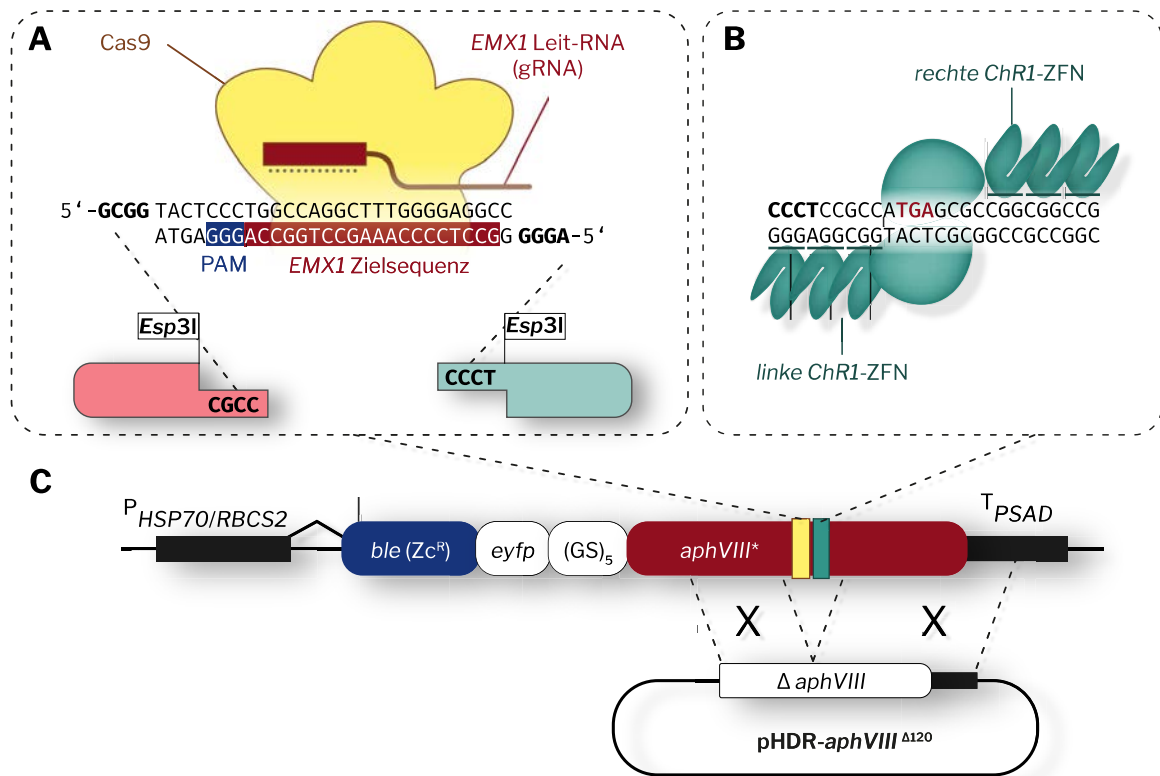


Abbildung 3.1: Schema der *aphVIII-Reparatursystems zum Testen neuer Nukleasen.**

A) Die neue Cas9-Zielsequenz aus dem humanen *EMX1*-Gen (Ran *et al.* 2015) wird als zwei sich überlappende Oligonukleotide über die *Esp3I*-Schnittstelle in die *aphVIII**-Testkassette kloniert (Methoden 2.2.2). **B)** Zielsequenz der *ChR1*-ZFNs (Sizova *et al.* 2013). In rot markiert (TGA) ist das Stoppcodon, das zur vorzeitigen Translationstermination führt. **C)** Schematischer Aufbau der *aphVIII*-Testkassette mit Reparatur Template (" *aphVIII* "). $P_{HSP70/RBCS2}$ = *HSP70A*- und *RBCS2*-Tandempromoter (Schroda *et al.* 2000). *ble* (Zc^R) = *ble* Resistenzgen gegen Zeocin (Stevens *et al.* 1996). *eyfp* = *enhanced yellow fluorescent protein* (Orm *et al.* 1996). $(GS)_5$ = 5x *GS*-Linker. *aphVIII* = Aminoglycosid 3'-Phosphotransferase-Gen (Sizova *et al.* 2001). *aphVIII** = Das *aphVIII*-Gen ist nach dem 620. bp durch die eingeführten Zielsequenzen unterbrochen, wodurch es zu einem frühzeitigen Translationsabbruch kommt und keine Resistenz gegen Paromomycin aufgebaut wird. Dem *aphVIII*¹²⁰-Gen auf dem Reparaturtemplate (pHDR-*aphVIII*^{Δ120}) fehlen die ersten 120 Aminosäuren. Das Reparaturtemplate alleine führt zu keiner Resistenz gegen Paromomycin. Nur bei erfolgreicher Rekombination der *aphVIII**-Testkassette mit der *aphVIII*¹²⁰-Donor-DNA wird ein funktionelles *aphVIII*-Gen gebildet.

3.1.2 Verwendung von ZFN in motilen *C. reinhardtii*-Stämmen

Um neue Transformationsparameter zu testen, wurde auf die *ChR1*-Zinkfinger-nukleasen zurückgegriffen, die von Sizova *et al.* (2013) bereits erfolgreich in *C. reinhardtii* angewendet wurden. Zuerst wurde die Testkassette in *C. reinhardtii*-Zellen transformiert und auf die *ble*-vermittelte Zeocin-Resistenz (Zc^R) hin selektiert. Zc^R -Klone wurden per PCR auf die komplette Integration der Testkassette hin überprüft. Diese Teststämme konnten dann mit *ChR1*-ZFN codierenden Plasmiden und Donor-DNA transformiert werden.

Als Donor-DNA wurde das um die ersten 120 bp verkürzte *aphVIII*-Gen (*aphVIII*^{Δ120}) verwendet. Die Donor-DNA alleine ist nicht in der Lage, eine Paromomycin-Resistenz (Pm^R) auszubilden, wird aber von der Zelle als Matrize erkannt, um nach einem DSB das 51 bp Insert

aus dem *aphVIII**-Gen der Testkassette herauszuschneiden. Nur wenn die *ChR1*-ZFNs exprimiert werden und das defekte *aphVIII**-Gen schneiden, kann mithilfe des *aphVIII^{Δ120}*-Donorplasmids das *aphVIII*-Gen repariert werden. Die Anzahl der Pm^R-Klone zeigt an, wie häufig solch ein Ereignis stattgefunden hat und dient als Maß für die Effizienz der verwendeten Nukleasen unter den jeweiligen Transformationsbedingungen (Abbildung 3.2 A). Als Referenz wurde der nicht motile Stamm „ZF37“ von Sizova *et al.* (2013) mit der Glasperlenmethode transformiert und es konnten etwa 4 Pm^R-Klone pro 10⁷ eingesetzten Zellen beobachtet werden. Dies entsprach in der Größenordnung der berichteten Effizienz der Autoren von etwa 2 Pm^R-Klonen pro 10⁷ eingesetzten Zellen (Sizova *et al.* 2013). In allen folgenden Transformationen wurden die Zellen per Elektroporation transformiert.

Im ersten Schritt wurde die *aphVIII*-EMX1-ChR1* Testkassette in den motilen, Zellwand-defizienten Stamm CC-3403 transformiert und auf Zeocin selektiert. Vier Zc^R-Klone (a, b, c, d) zeigten eine erhöhte YFP-Fluoreszenz und wurden als Teststämme für die folgenden Transformationen ausgewählt. Im zweiten Schritt wurden die Teststämme mit *ChR1*-ZFNs und dem *aphVIII^{Δ120}*-Donor durch Elektroporation transformiert und überprüft, ob die Paromomycin-Resistenz wiederhergestellt werden kann. Tatsächlich konnten zwischen 314 und 2500 Pm^R Klone per 10⁷ eingesetzten Zellen generiert werden (Abbildung 3.2 B, grüne Balken). Durch eine Temperaturerhöhung von 22 °C auf 33 °C während der Vorinkubation vor dem Ausplattieren konnte die Transformationseffizienz verdoppelt werden (+123 %, 332 Klone bei 22 °C und 743 Klone bei 33 °C, Abbildung 3.2 B, blauer / roter Balken).

Es wurde eine Variabilität unter den vier Teststämmen beobachtet. Da die Integration der Testkassette in das Kerngenom zufällig erfolgt, kann es zu unterschiedlichen Expressionsstärken des reparierten *aphVIII*-Gens kommen, was einen direkten Einfluss auf die Anzahl der entstehenden Pm^R-Kolonien hat. Zusätzlich beeinflusst die genomische Umgebung die Zugänglichkeit der Zielsequenz für die Nukleasen, das sich ebenfalls auf die Reparatureffizienz auswirkt.

Es konnte ein Elektroporationsprotokoll etabliert werden, das die Transformationseffizienz im Schnitt um das Dreihundertfache erhöht und die Verwendung von Zinkfingernukleasen für Genveränderungen in motilen Stämmen erlaubte.

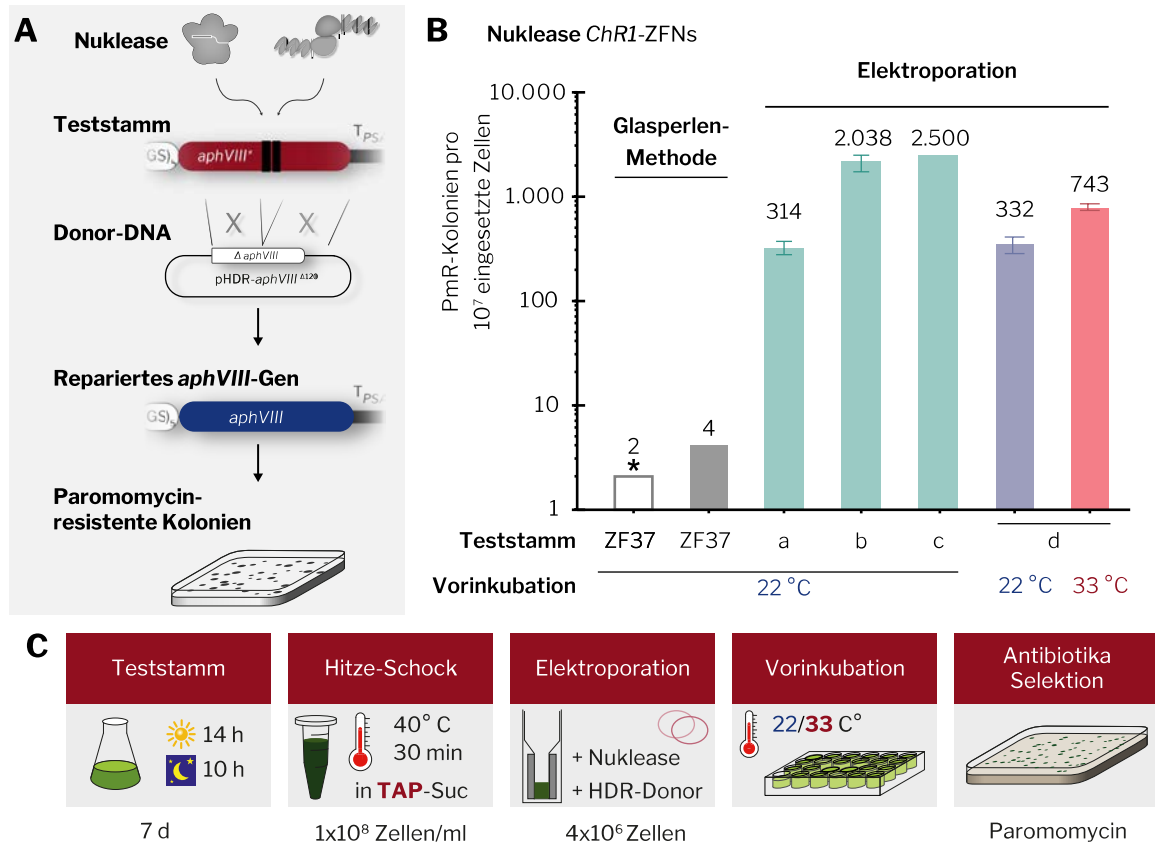


Abbildung 3.2: Elektroporation von ZFNs in motilen *C. reinhardtii*-Stämmen.

A) Übersicht der Methode. Es wurden verschiedene Teststämme mit der nicht-funktionellen *aphVIII*-Kassette hergestellt (Abbildung 3.1). Die Teststämme wurden anschließend mit *ChR1*-ZFNs und dem Reparaturtemplate transformiert. Wenn die Testkassette exprimiert und die Nuklease aktiv ist, kann das *aphVIII**-Gen repariert werden und die Resistenz gegen Paromomycin wird wiederhergestellt. Die Anzahl der Pm^R-Klone wird erfasst und gilt als Maß der Effizienz der verwendeten Nukleasen bei den jeweiligen Transformationsbedingungen. **B)** Vergleich der Reparatureffizienz der Glasperlen-Methode mit Elektroporation mit den Teststämmen ZF37, a, b, c und d. Vergleich der Vorinkubationstemperatur von 22 °C und 33 °C mit dem Teststamm d. In allen Experimenten wurden die Plasmid-exprimierten *ChR1*-ZFN verwendet (Sizova *et al.* 2013). Bei der Glasperlen-Methode wurden 10⁸ und bei der Elektroporation wurden 4 x 10⁶ Zellen pro Transformationsansatz verwendet. Wenn Fehlerbalken eingezeichnet sind, bezieht sich die Anzahl auf den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Transformationsexperimenten. * = Dieser Datenpunkt ist Sizova *et al.* (2013) entnommen und dient als Referenz. **C)** Übersicht des Transformationsprotokolls (Methoden 2.3.1).

Die so generierten Pm^R-Klone entstanden durch aktive ZFNs, die auf eine Zielsequenz im *ChR1*-Gen angepasst waren. Entsprechend wurde in diesen Klonen überprüft, ob sich auch Mutationen im *ChR1*-Gen befinden. Dazu wurde der genomische Abschnitt um die *ChR1*-Zielsequenz herum amplifiziert und sequenziert („Locus-PCR“). Zunächst konnten hier keine Genveränderungen festgestellt werden. Dabei traten zwei Fälle auf: Entweder handelte es sich um die Wildtyp(WT)-Sequenz oder der Abschnitt konnte mittels PCR nicht amplifiziert werden. Tatsächlich stellte sich heraus, dass die Mutationen meist Integrationen längerer Gensequenzen waren. Im nächsten Kapitel wird im Detail darauf eingegangen, wie die Verwendung von Donor-DNA-Sequenzen helfen kann, solche Mutationen zu identifizieren.

3.1.3 Identifikation von Geninaktivierungen mittels FLAG-Sequenz

Nach vielen Experimenten stellte sich heraus, dass in *C. reinhardtii* der Großteil der Mutationen durch Doppelstrangbrüche mit Insertionen von ca. 100 bp - 5 kb langen DNA-Sequenzen einhergeht (siehe auch Greiner 2014). Solche Mutationen sind schwer zu identifizieren, da durch die Insertionsgröße der Locus nicht mehr amplifiziert werden kann. Meist wird ein Teil des Selektionsplasmids oder chromosomale DNA an der Schnittstelle integriert.

Um dieses Problem zu umgehen, kann der Zelle eine konkurrierende Donor-DNA mit in den Transformationsansatz gegeben werden. Dies hat zur Folge, dass die Zelle nun auch diese Donor-DNA einbaut. Der Vorteil dabei ist, dass diese Sequenz klar definiert ist und somit als Primer-Bindestelle benutzt werden kann (Abbildung 3.3 A). Dazu wurde ursprünglich die Sequenz des FLAG-Epitops verwendet (Hopp *et al.* 1988). Da sich das FLAG-Epitop aber als nicht sehr spezifisch für *C. reinhardtii* herausstellte (Sizova *et al.* 2013), wurde auf die Funktion als Tag-Epitop verzichtet und die Sequenz konnte von 60 bp auf 30 bp verkürzt werden. Die Bezeichnung als FLAG-Sequenz wurde im Folgenden dennoch beibehalten, auch wenn die Sequenz nicht mehr für das ursprüngliche FLAG-Epitop codiert. Immer ist aber ein Stoppcodon enthalten, das zu einer Translationstermination des Zielgens führt. Damit dies funktioniert, muss die FLAG-Sequenz mit DNA-Sequenzen flankiert sein, die homolog zum Zielgen sind. Durch diese homologen Bereiche erkennen die DNA-Reparatursysteme die Donor-DNA als Reparaturtemplate und inserieren die FLAG-Sequenz in den definierten Leserahmen. Wird das FLAG-Insert an der Zielsequenz eingefügt, führt das also zu einer Inaktivierung des Zielgens.

Die FLAG-Sequenz kann mittels einer sogenannten „FLAG-PCR“ identifiziert werden: Dabei bindet ein Primer etwa 500 bp entfernt von der Schnittstelle im Zielgen und der zweite Primer bindet spezifisch an die FLAG-Sequenz. Diese PCR kann entsprechend in zwei Richtungen durchgeführt werden (FLAG-Vorwärts und FLAG-Rückwärts). Man erhält immer dann ein PCR-Produkt, wenn das FLAG-Insert in die Zielsequenz eingefügt wurde. Somit kann bei Mutanten, die durch Integration sehr langer DNA nicht mehr durch eine Locus-PCR identifiziert werden können, die FLAG-PCR für eine der Seiten immer noch ein Signal liefern. Eine beispielhafte FLAG-PCR Analyse ist in Abbildung 3.3 dargestellt: Sieben Mutanten („a-g“) werden erst mit einer Locus-PCR auf Veränderungen im Zielabschnitt untersucht. Nur bei vier Klonen gelingt die Amplifikation (Abbildung 3.3 B; „Klone a, b, f, g“). Bei Klon a ist die WT-Bande und eine kleinere unspezifische Bande sichtbar. Bei den Klonen b, f und g ist ein Größenunterschied sichtbar. Im nächsten Schritt werden dieselben Klone durch FLAG-PCRs untersucht. Nun können auch für die Klone c, d und e PCR-Produkte generiert werden. Dies bestätigt, dass es sich bei den Klonen b-g um Mutanten handelt (Abbildung 3.3 C).

Die Verwendung einer Donor-DNA, die eine kurze FLAG-Sequenz an der Zielsequenz einfügt, hilft bei der Identifikation von Mutanten mit langen Insertionen.

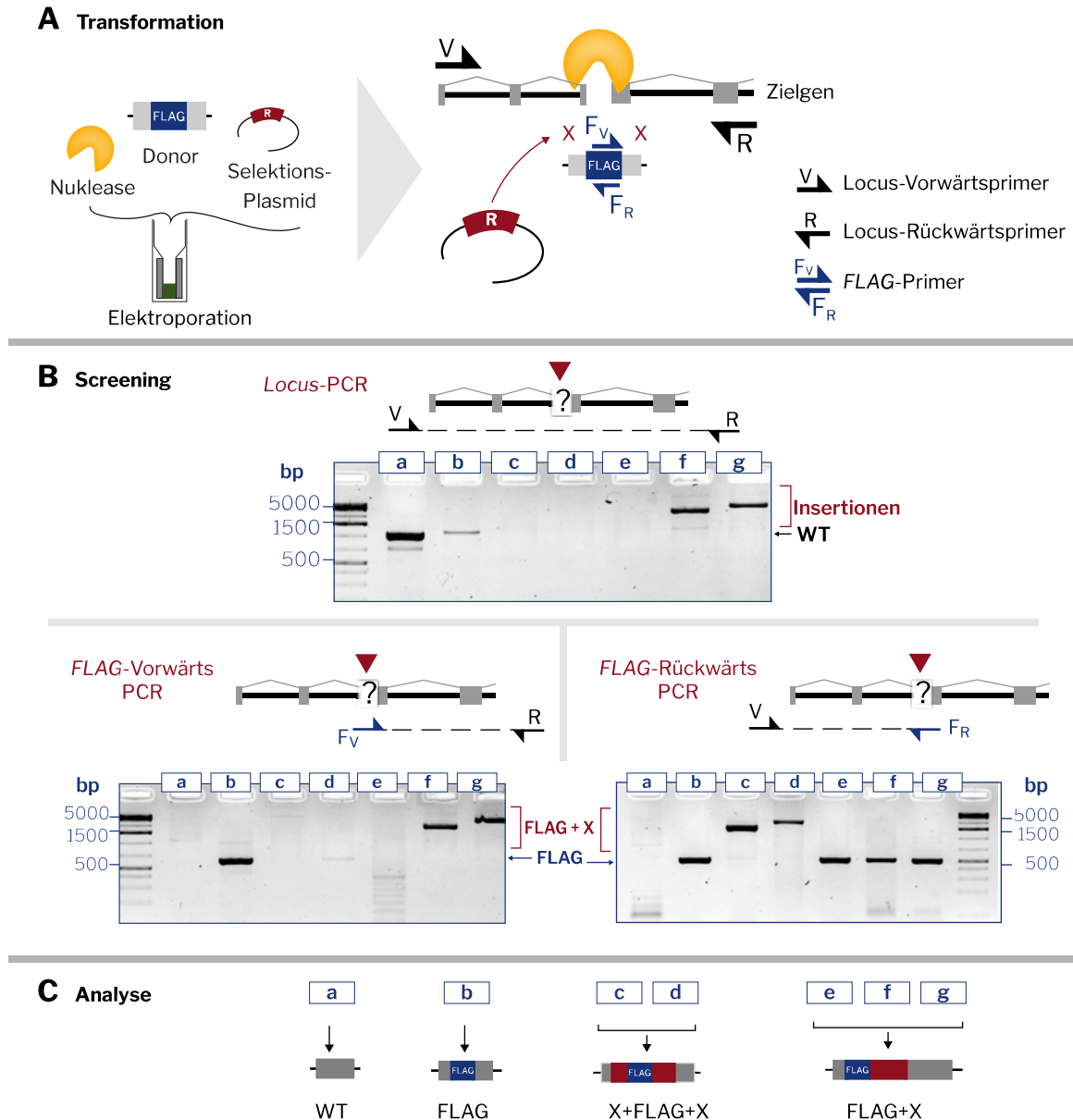


Abbildung 3.3: Das FLAG-Screening.

A) Schematische Darstellung der Substrate für die Algen-Transformation. Durch den Schnitt der Nukleasen am Zielgen kann die FLAG-Donor-DNA homolog integriert werden. Zusätzlich können Fragmente des Selektionsplasmids eingebaut werden. Zum Screenen werden ODNs verwendet, die die Zielsequenz flankieren (V+R) und an die FLAG-Sequenz binden (F_R+F_V). **B)** Exemplarische DNA-Agarosegel Bilder der drei möglichen Screening-PCRs von sieben ausgewählten Klonen (a-g). Locus-PCR mit den Primern V und R, höher molekulare Banden deuten auf Insertionen hin. FLAG-Vorwärts-PCR mit den Primern F_V und R und FLAG-Rückwärts-PCR mit den Primern V und F_R . Banden belegen die Integration der FLAG-Donor-DNA. **C)** Analyse derselben Klone mit schematischer Darstellung des mutierten Zielgens (schwarz-grau). Die blauen FLAG-Rechtecke spiegeln die Integration des FLAG-HDR-Donors wider. Rote Rechtecke stehen für unspezifische Insertionen der Plasmid-DNA (X).

3.1.4 Geninaktivierung nicht-selektierbarer Gene mit Zinkfingernukleasen

Inaktivierung der Kanalrhodopsine *ChR1* und *ChR2*

Die optimierten Transformationsprotokolle mit Plasmid-exprimierten ZFNs in motilen *C. reinhardtii*-Stämmen (Kapitel 3.1.2) wurden nun angewendet, um Genveränderungen in nicht-selektierbaren Genen durchzuführen. Zuerst wurden die zwei Kanalrhodopsin-Gene *ChR1* und *ChR2* mutiert, da für diese beiden Gene bereits ZFNs mit bestätigter Aktivität vorlagen (Sizova *et al.* 2013; Greiner *et al.* 2017). Allerdings gab es dabei zwei Limitationen: i) In früheren Experimenten konnten nur Mutanten in dem nicht-motilen Stamm CC-4350 hergestellt werden und ii) war die Vorselektion über einen *aphVIII*-Reparaturstamm notwendig. So musste immer erst ein Teststamm generiert werden, bevor man ein neues Zielgen inaktivieren konnte. Mit den optimierten Transformationsparametern konnten die Zinkfingernukleasen nun ohne Vorselektion durch die *aphVIII*-Reparatur direkt in den motilen Stamm CC-3403 transformiert werden. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Zuhilfenahme eines Markergens notwendig war, um eine Vorselektion transformierter Zellen zu ermöglichen. Dies liegt darin begründet, dass bei einer konventionellen Transformation nur 50-500 von den 4×10^6 Zellen transformiert werden. Dazu wurden die Antibiotikaresistenzgene *aphVII* und *aphVIII* oder das Argininosuccinat-Lyase-Gen (*ARG7*), das eine in diesem Stamm vorliegende Arginin-Auxotrophie komplementiert, verwendet. Wie im Kapitel 3.1.3 beschrieben, wurde auch hier ein Donorplasmid verwendet, das eine 60 bp lange FLAG-Sequenz an der Schnittstelle einfügt und von zwei homologen Bereichen flankiert wird (664 + 1896 bp). Das ganze 2600 bp lange Donorkonstrukt wurde als zirkuläres Plasmid transformiert.

Es wurden die für die *ChR1*-ZFN codierenden Plasmide, das *ChR1*-FLAG-Donorplasmid und das *ARG7*-Selektionsplasmid mittels Elektroporation in den motilen Stamm CC-3403 transformiert. 96 Arginin-prototrophe (*ARG*⁺)-Klone wurden mit FLAG-PCR untersucht und es konnten 8 FLAG-Integrationen an der *ChR1*-Zielsequenz nachgewiesen werden (Abbildung 3.4 A+D, „Plasmid 2600“). Die Frequenz lag mit 8 % auf einem vergleichbaren Niveau zu den Experimenten, in denen mit einem Teststamm vorselektiert wurde (3 % bzw. 8 %; Greiner *et al.* 2017; Sizova *et al.* 2013). Unter den gleichen Bedingungen konnte mit den *ChR2*-ZFN-Plasmiden in 8 der 96 analysierten *ARG*⁺-Klone das *ChR2*-Gen inaktiviert werden (Abbildung 3.4 B+D, „Plasmid 2800“).

Damit konnten zum ersten Mal in motilen *C. reinhardtii*-Zellen, ohne vorherige Herstellung eines Teststamms, Gene mit Zinkfingernukleasen inaktiviert werden.

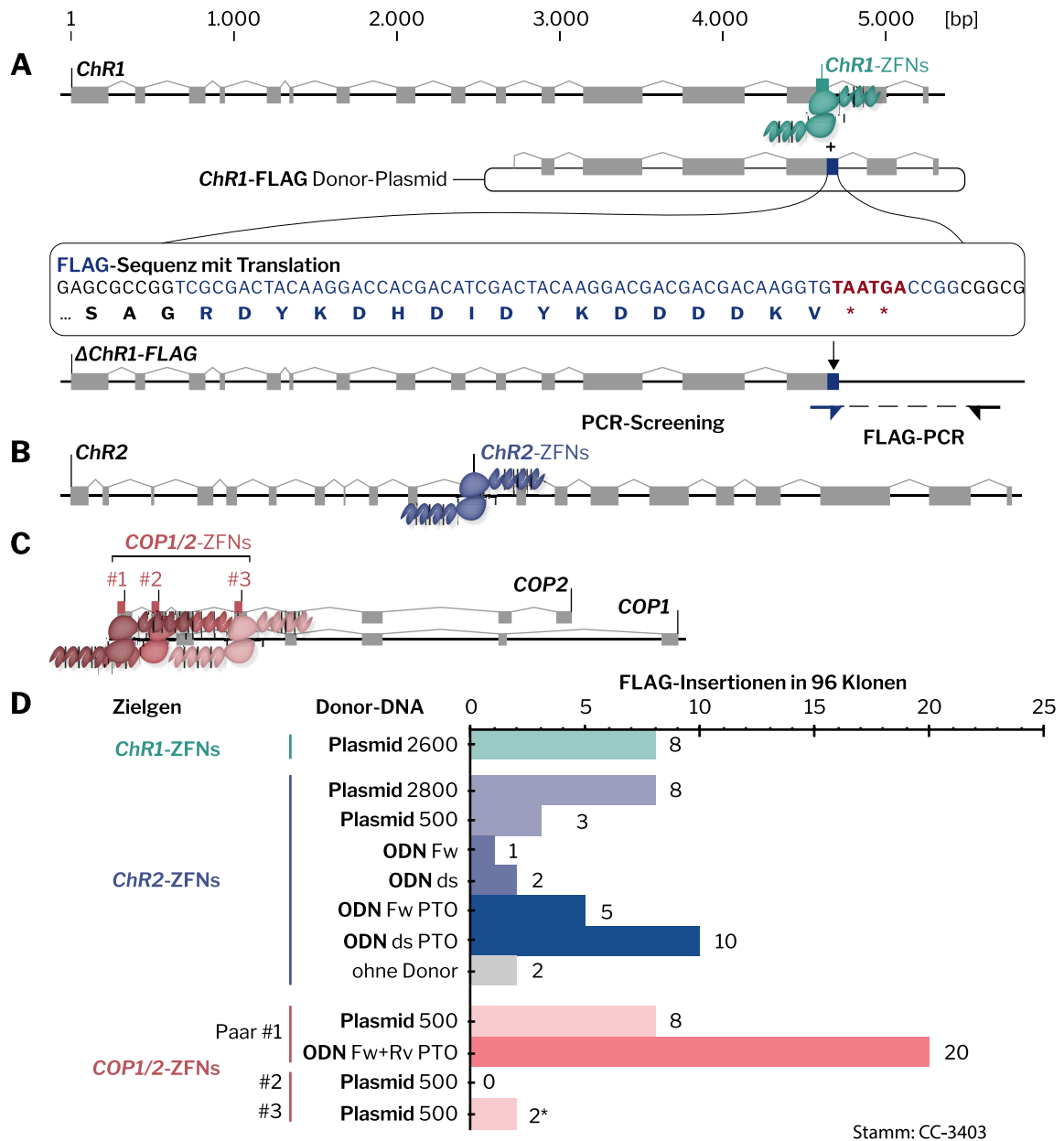


Abbildung 3.4: Geninaktivierung mit Zinkfinger-nukleasen.

A) Karte des *Chr1*-Genlocus (Cre14.g611300). Graue Rechtecke stellen Exons dar. *Chr1*-ZFNs = ZFN Zielsequenzen. *FLAG* = Insertionssequenz mit Translation und Stoppcodons (*). "*Chr1*-*FLAG*" = Genmodell des *Chr1*-Gens nach Insertion der *FLAG*-Sequenz. PCR-Screening nach Mutanten mithilfe von *FLAG*-spezifischen ODNs. **B)** Karte des *Chr2*-Genlocus (Cre02.g085257) und der *Chr2*-ZFN Zielsequenz. **C)** Karte des *COP1/2*-Genlocus (Cre01.g002500) und der drei *COP1/2*-ZFN Zielsequenzen. **D)** Anzahl der *FLAG*-Insertionen per 96 analysierten Klonen. *Plasmid 2600*, *2800*, *500* = Es wurden Donorplasmide mit 2600 bp, 2800 bp bzw. 500 bp langen homologen Bereichen verwendet. *ODN* = Als Donor-DNA wurden 90 bp lange (einzelsträngige) Oligonukleotide verwendet. *Fw* = ODN ist in der Vorwärts-orientierung. *PTO* = ODNs mit je drei 5'- und 3'-Thiophosphorsäureester-Schutzbindungen. *Ohne Donor* = Hier wurde nur die Nuklease ohne Donor-DNA eingesetzt. Die Anzahl der Mutanten beziehen sich hier nicht auf *FLAG*-Insertionen, sondern auf Mutationen insgesamt. *ds* = Zwei komplementäre ODNs wurden zu doppelsträngigen DNA-Molekülen hybridisiert. *Fw+Rv* = Hier wurden zwei ODNs in komplementärer Orientierung ohne Hybridisierung eingesetzt. * = Hochrechnung: 1 Mutante in 48 analysierten Klonen.

Kurze Oligonukleotide eignen sich als Donor-DNA

Bisher wurden als Donor-DNA Plasmide mit homologen Bereichen von 1896 bp und 664 bp für *ChR1* bzw. 2002 bp und 774 bp für *ChR2* verwendet. Dazu wurde die FLAG-Sequenz über eine Fusions-PCR an der vorhergesagten Schnittstelle eingefügt und in ein leeres Plasmid kloniert. Um diesen Klonierungsschritt zu beschleunigen, wurde überprüft, wie sich kürzere Donor-DNA Moleküle auf die Rekombinationsrate auswirken. Alle Donorsubstrate enthalten die gleiche 30 bp lange FLAG-Sequenz. Die Verkürzung der Donor-DNA auf 500 bp (30 bp FLAG + 2x 235 bp homologe Bereiche) reduzierte die FLAG-Integrationen in 96 untersuchten Klonen von 8 auf 3 (Abbildung 3.4 D, „Plasmid 500“). Einzel- und doppelsträngige 90 bp Oligonukleotide (ODNs) (2x 30 bp) reduzierten die FLAG-Integrationen in 96 untersuchten Klonen auf 1 bzw. 2 (Abbildung 3.4 D, „ODN Fw/ds“). Waren die ODNs aber mit Thiophosphorsäureester-Schutzbindungen (PTO) versehen, konnten in 96 untersuchten Klonen 5 bzw. 10 FLAG-Integrationen beobachtet werden (Abbildung 3.4 D, „PTO“). Wird die Donor-DNA weggelassen, fanden sich in 96 sequenzierten Klonen 2 spontane Mutanten, eine 8 bp Deletion und eine 22 bp Integration (Abbildung 3.4 D, „ohne Donor“).

Zwei 90 bp lange doppelsträngige Oligonukleotide mit PTO-Schutzbindung erzeugen etwa gleich viele FLAG-Integrationen wie 2800 bp lange Donorplasmide und bieten somit ein optimales Donorsubstrat zur Geninaktivierung.

Inaktivierung von *COP1/2*

Um zu prüfen, ob sich neben *ChR1+2* auch andere Gene mittels ZFN in motilen Stämmen inaktivieren lassen, wurden das *COP1/2*-Gen ausgewählt. Die ZFNs für das *ChR2*-Gen wurden von der Firma Sigma-Aldrich entworfen und getestet. Dazu wurde die Aktivität von 10 ZFN-Paaren bestimmt und nur das beste Paar verwendet. Tatsächlich hat diese zusätzliche Aktivitätsmessung zwar zu einem sehr effizienten ZFN-Paar für das *ChR2*-Gen geführt, ist aber auf Grund der außerordentlich kosten- und zeitintensiven Ausarbeitung impraktikabel. Deshalb wurden für *COP1/2* vier ZFN-Paare kommerziell entwickelt, auf eine zusätzliche Aktivitätsprüfung wurde aber verzichtet. Da sich eine Zinkfinger-Bindedomäne nicht klonieren ließ, wurden lediglich drei der vier ZFN-Paare verwendet. Als Donor-DNA wurden zuerst 500 bp Donorplasmide verwendet, die zusammen mit den ZFN-Plasmiden und dem *ARG7*-Selektionsmarker transformiert wurden. Je 96 *ARG⁺*-Klone wurden untersucht und für die *COP1/2*-ZFN Paare #1, #2, #3 wurden je 8, 0 und 2 FLAG-Mutanten identifiziert (Abbildung 3.4 C+D, „*COP1/2*-ZFNs“). Mit der Verwendung von komplementären PTO-geschützten einzelsträngigen ODNs konnte die Anzahl der FLAG-Mutanten für Paar #1 auf 20 gesteigert werden (Abbildung 3.4 D, „Paar #1 ODN“).

Mindestens zwei der vier ZFN-Paare waren also aktiv und eines davon eignete sich als effiziente Nuklease, um Mutanten im *COP1/2*-Gen zu generieren.

Diese Ergebnisse an *COP1/2* können nicht für andere Gene verallgemeinert werden, deuten aber darauf hin, dass auch ohne einen vorherigen Aktivitätstest eine gute Chance besteht, dass mindestens eines von vier ZFN-Paaren für Genmutationen verwendet werden kann. Trotz der experimentellen Vereinfachung, die keinen neu hergestellten Teststamm erforderlich macht, und der Tatsache, dass Oligonukleotide als Donor-DNA verwendet werden können, bleibt die Arbeit mit ZFNs ein zeitintensives und teures Unterfangen. Werden für ein neues Zielgen vier ZFN-Paare getestet, müssen acht ZF-Bindedomänen bestimmt, Codon-adaptiert synthetisiert und an die *FokI*-Domäne kloniert werden (Methoden 2.2.3). Ist jedoch ein effizientes ZFN-Paar bestimmt, können damit Mutanten mit einer Effizienz von bis zu 20 % hergestellt werden (Abbildung 3.4 D, „*COP1/2* Paar #1“).

3.1.5 Kanalrhodopsin-1 ist hauptverantwortlich für Phototaxis

Durch die verbesserte Transformationseffizienz der Elektroporation war es nicht nur möglich, motile *ChR1*- und *ChR2*-Mutanten herzustellen, sondern auch mehrere Mutationen in einem Stamm zu vereinen. So wurde durch Dr. Irina Sizova eine Sammlung von Mutanten hergestellt, die genauere Phototaxismessungen ermöglichten. Dazu stellte Sizova einen *aphVIII*-Selektionsstamm aus dem motilen Stammhintergrund CC-3403 her, der nun die Zielsequenzen für die *ChR1*- und *ChR2*-ZFNs in der Testkassette enthielt (Stamm „*RR6*“). Durch die *aphVIII*-Reparaturselektion wurde erst das *ChR1*-Gen (Stamm „*Δchr1*“) und in einer zweiten Transformation anschließend durch Koselektion mit dem *aphVII*-Marker das *ChR2*-Gen inaktiviert (Stamm „*Δchr1/Δchr2*“). Parallel wurde in einem anderen Selektionsstamm („*R2*“) das *ChR2*-Gen einzeln inaktiviert. So standen die drei Stämme *Δchr1*, *Δchr2* und *Δchr1/Δchr2* im Vergleich zum WT (CC-3403) für Phototaxismessungen zur Verfügung. Die Phototaxis wurde mit einer für diesen Zweck entwickelten Lichtstreuapparatur gemessen (Uhl & Hegemann 1990), die die Streuung der Algensuspension mit Infrarotlicht aufzeichnet. Orientieren sich Zellen synchron in eine Richtung, ändert sich die Intensität der Streuung. Belichtet man die Algenpopulation mit blauem Licht, reagieren die Algen mit einem gerichteten Wechsel ihrer Schwimmrichtung, das durch die Spannungsänderung an den Messdioden aufgezeichnet wird. Durch Reduktion der Lichtstärke des monochromatischen Anregungslichts, bis keine dynamische Reaktion der Algenzellen mehr zu beobachten ist, kann die Sensitivität der Reizwahrnehmung bestimmt werden. Zur Veranschaulichung wurden die Algensuspensionen in Petrischalen einseitigem Weißlicht ausgesetzt und der Zustand nach sechs Minuten festgehalten (Abbildung 3.5 A).

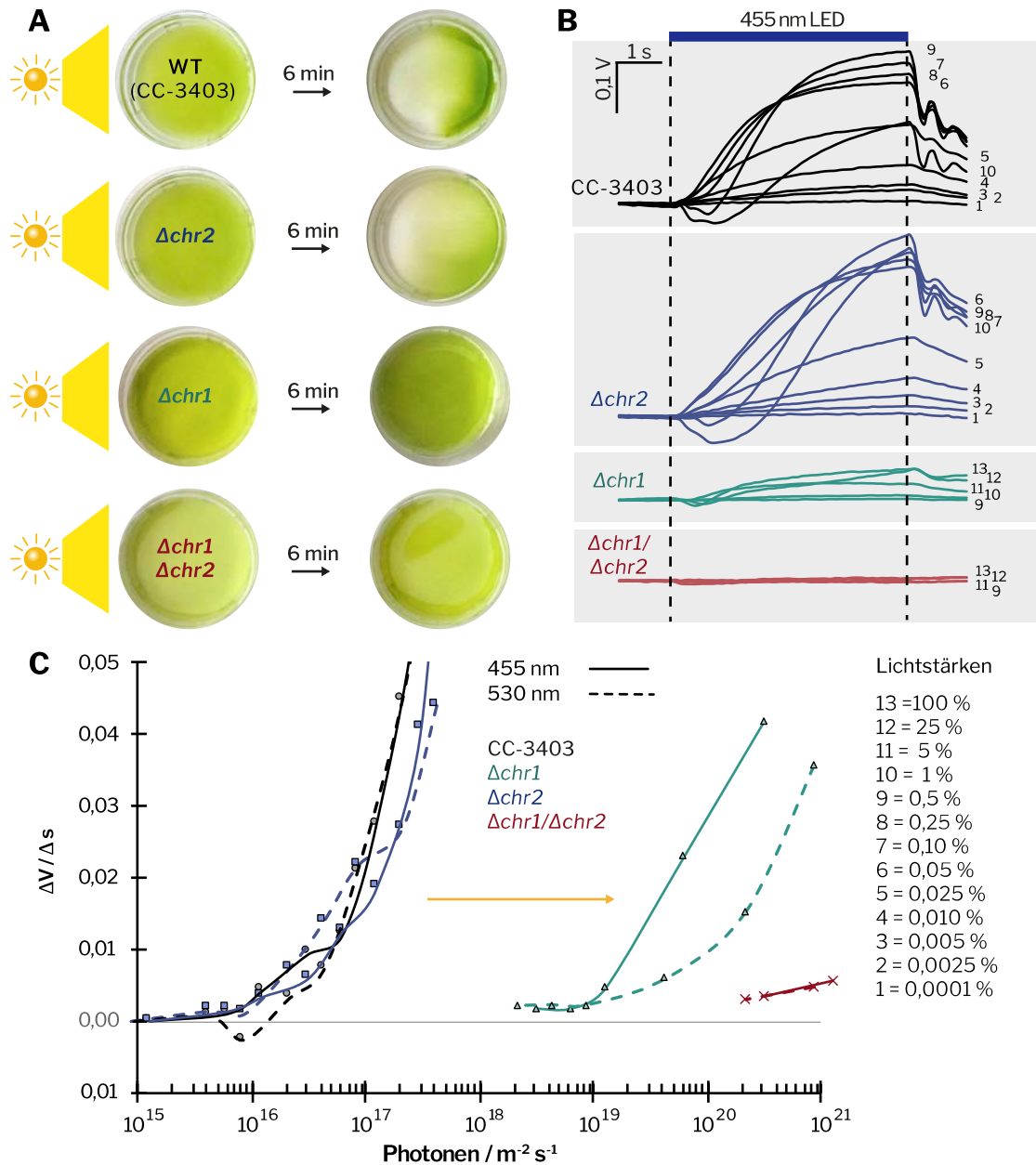


Abbildung 3.5: Phototaxismessungen der ChR-Mutanten.

A) Makroskopische Beobachtung der Phototaxis in einer Petrischale ($\varnothing = 20$ mm) nach Belichtung für sechs Minuten mit einseitiger Belichtung durch Tageslicht. **B)** Lichtstreu曲ven des Wildtypstamms (CC-3403), der ChR2-Mutante ($\Delta chr2$), der ChR1-Mutante ($\Delta chr1$) und der Doppelmutante ($\Delta chr1/\Delta chr2$). Phototaktische Antwort auf abfallende Lichtintensitäten der Wellenlänge $\lambda=455$ nm. 100 % = $1,25 \times 10^{21}$ Photonen $m^{-2} s^{-1}$. Nummern beziehen sich auf die Lichtintensitäten wie in der Legende beschrieben. **C)** Lichttitrationskurven für Anregung mit 455 nm (durchgezogene Linien) und 530 nm (gestrichelte Linien). Geplottet ist die initiale phototaktische Antwort ($\Delta V/\Delta s$) gegen die Lichtintensität (auf die Wellenlänge normalisiert). Diese Abbildung ist in veränderter Form in Greiner et al. (2017) erschienen und unterliegt dem Copyright der American Society of Plant Biologists.

Wurden Zellen des WT Stamms CC-3403 in der Petrischale für sechs Minuten einseitigem Tageslicht ausgesetzt, bewegten sich die Algenzellen weg vom Licht und reicherten sich an dem lichtabgewandten Rand der Petrischale an (Abbildung 3.5 B, „CC-3403“). Im Lichtstreuexperiment konnte für WT-Zellen eine Sensitivität von 10^{16}

Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 455 nm und 530 nm gemessen werden (Abbildung 3.5 C, „CC-3403“). Algenzellen, in denen das *ChR2*-Gen inaktiviert wurde (Δchr2), verhielten sich ähnlich dem WT (Abbildung 3.5 B+C, „ Δchr2 “). Wurde allerdings das *ChR1*-Gen inaktiviert, war die Phototaxis offensichtlich gestört, was durch weitergehende Lichtstreuexperimente bestätigt wurde, bei denen nur noch bei sehr hohen Lichtstärken eine Reizantwort zu messen war. Die Sensitivität reduzierte sich um drei Größenordnungen auf 10^{19} Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 455 nm bzw. 10^{20} Photonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 530 nm (Abbildung 3.5 B+C, „ Δchr1 “). Dadurch ergab sich eine zehnfach erhöhte Sensitivität bei Belichtung mit 455 nm. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Absorptionsspektrum von aufgereinigtem ChR2-Protein, das bei 440-480 nm sein Absorptionsmaximum zeigt (Stehfest & Hegemann 2010). Darüber hinaus war die Δchr1 -Mutante in der Petrischale nicht mehr in der Lage, sich zum Licht zu orientieren (Abbildung 3.5 B, „ Δchr1 “). Wurden beide Kanalrhodopsine inaktiviert, war weder in der Petrischale noch durch die sensitivere Lichtstreuungsmessung eine Reizantwort der Algen festzustellen (Abbildung 3.5 B+C, „ $\Delta\text{chr1}/\Delta\text{chr2}$ “).

Dieses Experiment zeigt, dass zwar beide Kanalrhodopsine eine Reizwahrnehmung in der Alge auslösen können, aber im Stamm CC-3403 die Aktivität von ChR1 hauptverantwortlich für die Phototaxis ist.

3.2 Gen-Veränderung mit CRISPR/Cas9

Wie im vorhergehenden Kapitel ausgeführt, konnten Zinkfingernukleasen zwar effizient als programmierbare Nukleasen in *C. reinhardtii* verwendet werden, das korrekte Design der Zinkfinger-Bindedomänen für neue Zielsequenzen ist aber ein außerordentlich zeitintensiver Prozess. Nukleasen des *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR) Typ II-Systems, wie die Nuklease *CRISPR-associated 9* (Cas9), bieten hingegen den großen Vorteil, dass die Bindespezifität durch die interagierende gRNA bestimmt wird (Kapitel 1.2.2). Die Zielsequenz ist also direkt komplementär zur gRNA und kann ohne weiteres Design abgelesen werden. Für die hier verwendete Cas9-Nuklease aus *Streptococcus pyogenes* (*SpCas9*) ist die Zielsequenz durch die Bindung der gRNA über 18-23 bp an die DNA definiert. Die einzige notwendige Erweiterung besteht darin, dass die Bindesequenz vom *protospacer adjacent motif* (PAM) gefolgt wird. Für *SpCas9* ist die PAM „NGG“, wobei „N“ für jede beliebige Base und „G“ für die Base Guanin steht. Es kann also prinzipiell jede Zielsequenz der Form $\text{N}_{19-24}\text{GG}$ geschnitten werden. In diesem Kapitel wird gezeigt, wie diese Methode mithilfe des *aphVIII*-Testsystems für *C. reinhardtii* etabliert wurde und anschließend damit 20 Gene inaktiviert bzw. gezielt verändert wurden.

3.2.1 Cas9 als synthetisches Ribonukleoprotein ist funktionell in *C. reinhardtii*

Um CRISPR/Cas9 in *C. reinhardtii* zu etablieren, musste zunächst ein Weg gefunden werden, das Cas9-Protein und die gRNA funktionsfähig und in ausreichender Menge in die Zelle einzubringen oder in dieser zu exprimieren. In der Regel, so auch bisher mit den ZFNs, wurden dazu Nuklease-codierende Plasmide in die Zellen eingebracht (Sizova *et al.* 2013). Die Zelle selbst exprimiert dann das Cas9-Protein bzw. transkribiert die gRNA. Trotz intensiver Versuche gelang es zunächst nicht, mit Plasmid-exprimiertem Cas9 Mutanten zu generieren (Kelterborn 2013; Greiner 2014). Zwar konnte die Expression der beiden Komponenten einzeln nachgewiesen und sogar Cas9-induzierte Genveränderungen in selektierbaren Genen festgestellt werden, allerdings war die Effizienz zu gering, um Mutationen in nicht-selektierbaren Genen zu identifizieren (Daten nicht gezeigt, Dr. Lina Sciesielski, persönliche Kommunikation). Erst in Folgeexperimenten gelang es Dr. Andre Greiner, Mutanten mit Plasmid-exprimiertem Cas9 zu generieren. Dabei verwendete Greiner eine im Vergleich zu *SpCas9* (MW: 158 kDa) kleinere Cas9 Variante aus *Staphylococcus aureus* (*SaCas9* MW: 126 kDa), und ließ die Expression bei höheren Umgebungstemperaturen stattfinden (Greiner *et al.* 2017).

Eine Alternative zur Plasmid-basierten Expression des Cas9 in *C. reinhardtii* stellt die direkte Transformation synthetischer Cas9-Protein / gRNA-Komplexe dar. Dazu wird das Cas9-Protein mit einem C-terminalen Poly-Histidin-Peptid versehen, rekombinant in *E. coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die gRNA kann als *single-guide* RNA (sgRNA) im Labor mit dem Enzym Reverse Transkriptase hergestellt werden (Zschieschang 2018). Alternativ wird die gRNA aus den zwei Komponenten synthetisiert: Der 40 bp kurzen, Zielsequenz-spezifischen CRISPR-RNA (crRNA) und der 87 bp langen konstanten *trans-activating* crRNA (tracrRNA), die als Bindeglied zwischen dem Cas9-Protein und der crRNA dient. Die beiden RNAs werden durch Erhitzen und langsames Abkühlen zu einer intakten gRNA hybridisiert. Durch Inkubation des rekombinanten Cas9-Proteins mit der gRNA bei 37 °C kann sich der aktive Cas9-Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex bilden (Abbildung 3.6 A, Methoden 2.3.3).

Für die erfolgreiche Injektion des Cas9-RNPs in Algenzellen durch Elektroporation stellt die Leitfähigkeit der Zellsuspension einen kritischen Faktor dar. Die optimale Zusammensetzung des Elektroporationspuffers und der RNP-Konzentration wurde mithilfe des *aphVIII*-Reparatursystems untersucht. Der Teststamm „d“ (Kapitel 3.1.1) enthält die Cas9-Zielsequenz des humanen *EMX1*-Gens und kann deshalb direkt mit Cas9-RNPs getestet werden. So wurden Algenzellen in unterschiedlichen Puffern resuspendiert und mit dem Cas9:*EMX1*-RNP und der *aphVIII*^{A120} Donor-DNA transformiert. Zuerst wurden 6 pmol Cas9-RNP pro Elektroporation benutzt. Das entspricht in etwa der fünffachen molaren Menge, die bei einer vergleichbaren Elektroporation mit Zinkfingerplasmiden eingesetzt wurde. Bei ersten Experimenten unter Verwendung von konventionellem TAP-Medium bei der Elektroporation wurden 973 Pm^R-Kolonien pro 10⁷ eingesetzten Zellen generiert (Abbildung 3.6 B). Dadurch konnte erstmalig der experimentelle Beweis dafür erbracht

werden, dass Cas9 auch in *C. reinhardtii* funktionsfähig ist. Durch Zugabe von Saccharose (TAP-Suc) konnte die Anzahl an Pm^R-Klonen zudem um 23 % gesteigert werden. Dieser Puffer wird regulär bei der Transformation reiner DNA für ZFNs verwendet (Kapitel 3.1.2). Die Effizienz mit dem kommerziellen Puffer *MAX Efficiency Transformation Reagent for Algae* (ME) war mit derjenigen in TAP-Suc vergleichbar. Wurde der ME-Puffer jedoch mit Saccharose (ME-Suc) versetzt, erhöhte sich die Anzahl auf 1805 Pm^R-Kolonien (+85 %, Abbildung 3.6 B). Alle weiteren Experimente wurden konsequenterweise mit ME-Suc-Puffer durchgeführt.

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 22 °C auf 33 °C vor dem Ausplattieren, das bei den ZFN-Experimenten eine höhere ZFN-Expression zur Folge hatte, führte mit Cas9-RNPs zu keiner Verbesserung der Effizienz (Abbildung 3.6 B). Außerdem wurde untersucht, ob auch hier kürzere Donor-Moleküle verwendet werden können (Abbildung 3.6 B). Donorplasmide mit je 250 bp langen homologen Bereichen reduzierten im Vergleich zu Donorplasmiden mit langen homologen Bereichen (806 Pm^R-Kolonien) die Anzahl an Pm^R-Kolonien (739 Pm^R-Kolonien) um 8 %. Mit kurzen Oligonukleotiden mit je 30 bp langen homologen Bereichen sank die Effizienz deutlich und es konnten maximal 42 % der Pm^R-Transformanten generiert werden (Abbildung 3.6 B). Mit doppelsträngigen ODNs (42 %, 337 Pm^R-Kolonien) wurden mehr Pm^R-Kolonien als mit einzelsträngigen ODNs erzeugt (8-31 %, 66-251 Pm^R-Kolonien). Bei einzelsträngigen ODNs war eine starke Polarität erkennbar: In der nicht-PAM Orientierung (komplementär zur Strangorientierung, in der sich die „NGG“ PAM der Cas9-Zielsequenz befindet) wurden fast 2,5 x so viele Pm^R-Kolonien wie mit den komplementären ODNs generiert (251 zu 90 Pm^R-Kolonien). Eine Verlängerung der homologen Bereiche auf je 50 bp führte zu keiner Effizienzsteigerung (Abbildung 3.6 B).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass für Insertionen, die von der homologen Rekombination abhängig sind, lange Donorplasmide den höchsten Wirkungsgrad aufweisen. Ferner weisen kurze doppelsträngige, 30 bp lange ODNs zwar eine verringerte Effizienz auf, stellen aber dennoch eine funktionelle Alternative dar, falls auf die Klonierung eines Donorplasmids verzichtet werden soll.

Das hier etablierte Protokoll (Abbildung 3.6) eignet sich, um Cas9-RNPs für Geninaktivierungen zu verwenden. Es können sowohl lange Donorplasmide als auch kurze Oligonukleotide als Donorsubstrat benutzt werden.

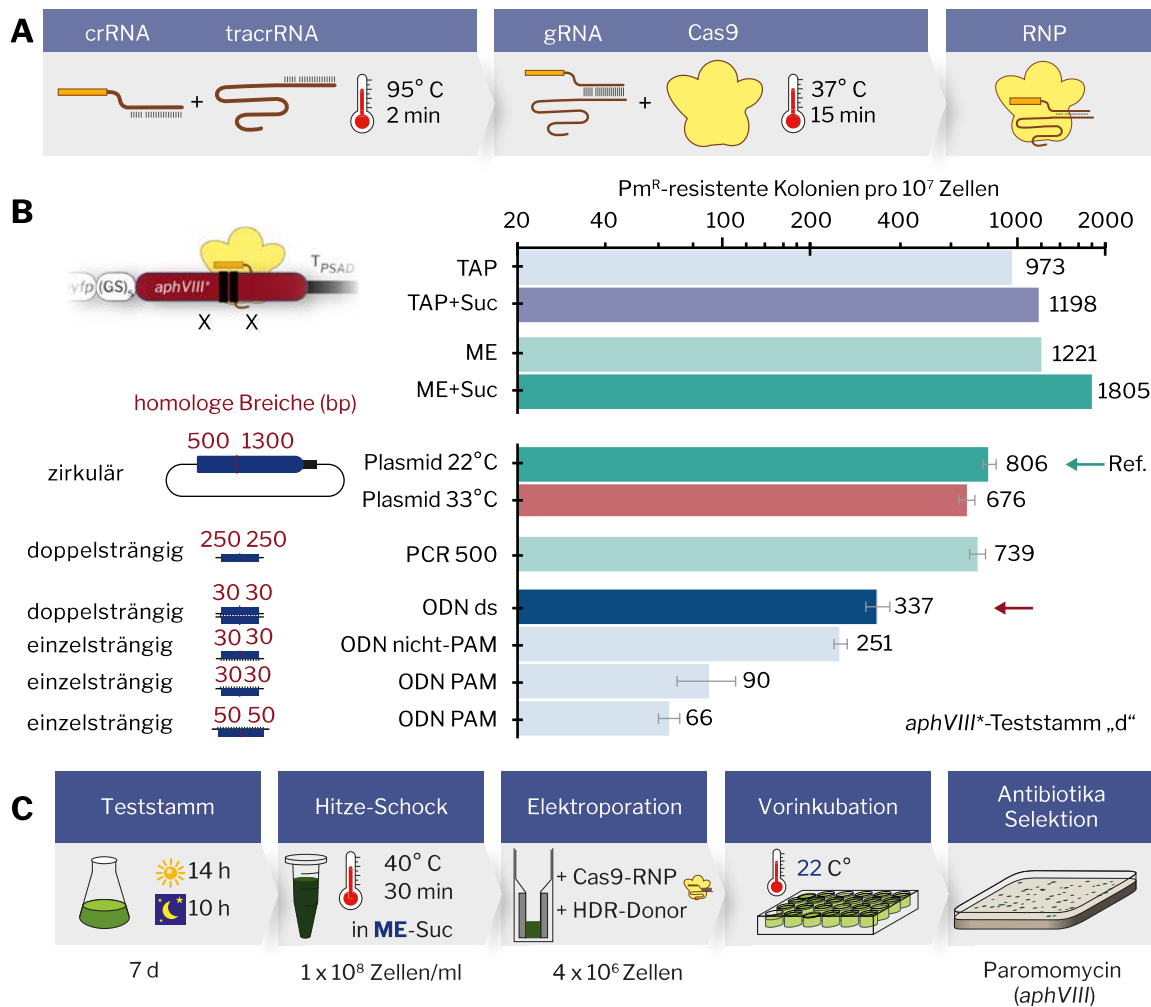


Abbildung 3.6: Etablierung von Cas9-RNPs mit dem *aphVIII*-Reparatursystem.

A) Hybridisierung der CRISPR-RNA (crRNA) mit der Gerüst-RNA (tracrRNA) zu einer funktionellen Leit-RNA (gRNA) und Assemblierung der gRNA mit Cas9-Protein zu einem Cas9-Ribonukleoprotein (RNP). **B)** Optimierung der Transformationsparameter. Alle Experimente wurden mit dem *aphVIII*^{*}-Teststamm „d“ (Abbildung 3.2) durchgeführt. Analyse verschiedener Elektroporationspuffer: TAP = Tris-Acetat-Phosphat Medium. +Suc = mit Zugabe von Saccharose (40 ! M). ME = MAX Efficiency-Puffer. In allen weiteren Experimenten wurde der ME-Suc-Puffer verwendet. 22 °C / 33 °C = Temperatur der Vorinkubation. Plasmid = Donor-DNA mit 500 und 1300 bp langen homologen Bereichen liegt auf einem Plasmid. PCR 500 = Donor-DNA mit je 250 bp langen homologen Bereichen liegt als doppelsträngiges lineares PCR-Produkt vor. ODN = Oligonukleotide mit 30 bp langen homologen Bereichen (60 bp Gesamtgröße). Analyse verschiedener Donortypen mit unterschiedlichen homologen Bereichen. ds = zwei komplementäre ODNs wurden zu doppelsträngiger DNA vereint. PAM = ODNs sind in der Orientierung des PAM-Stranges. nicht-PAM = Orientierung der ODNs ist komplementär zum PAM-Strang. Grüner Pfeil (Ref.) markiert Vergleichsbedingung. Roter Pfeil markiert Donor-Substrat für zukünftige Experimente. **C)** Darstellung des Transformationsprotokolls mit Cas9-RNPs.

3.2.2 Inaktivierung nicht-selektierbarer Gene mit CRISPR/Cas9

Wie bereits dargelegt, konnten Cas9-RNPs im *aphVIII*-Testsystem erfolgreich verwendet werden. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob auf diesem Weg auch Genmanipulationen von endogenen, nicht selektierbaren Genen möglich sind.

Um die Aktivität von Cas9 mit der von ZFNs zu vergleichen, wurde das *COP1/2*-Gen ausgewählt und potenzielle Cas9-Zielsequenzen identifiziert. Wie oben beschrieben, umfasst die Erkennungssequenz für *SpCas9* in der Regel 20 bp, sowie die „NGG“ PAM. Bei der Auswahl neuer Zielsequenzen muss sichergestellt werden, dass keine weiteren oder ähnlichen Zielsequenzen im Genom vorkommen, um keine ungeplanten zusätzlichen Doppelstrangbrüche zu induzieren (*off-target* Effekte). Außerdem wurde gezeigt, dass nicht alle Erkennungssequenzen gleich gut funktionieren (Doench *et al.* 2014, 2016). Zur Vorhersage spezifischer und effizienter gRNAs wurden in unserem Labor die Onlinetools von *CRISPR-P* von Liu *et al.* (2017) und *CRISPOR* von Haeussler *et al.* (2016) erfolgreich für das Design der gRNAs dieser Arbeit verwendet (Tabelle 15).

Für *COP1/2* wurde eine Zielsequenz im ersten Exon ausgewählt (Abbildung 3.7 A), die entsprechende crRNA erst mit der tracrRNA gepaart und schließlich mit aufgereinigtem rekombinanten *SpCas9*-Protein assembliert. Die Zellen wurden synchronisierend kultiviert und vor der Transformation mit einem Hitzeschock behandelt (Methoden 2.3.3). Der Cas9/gRNA-RNP-Komplex wurde zusammen mit unterschiedlichen Donor-DNA-Substraten und einem Arginin-Selektionsplasmid in die Algenzellen transformiert. Die Donor-DNA, bestehend aus der von homologen Bereichen flankierten 30 bp FLAG-Sequenz, dient der Identifikation potenzieller Mutanten und der Einführung eines Stoppcodons (Kapitel 3.1.3). Im ersten Experiment wurden verschiedene Donor-DNA-Substrate verglichen, die sich nur in der Länge der homologen Bereiche unterschieden, während die FLAG-Sequenz konstant blieb. Untersucht wurden zwei Parameter: i) die Mutationsrate (alle Mutanten) und ii) die HDR-Rate (präzise Integration der FLAG-Sequenz).

Wurde die Donor-DNA als Plasmid mit je 235 bp langen homologen Bereichen zugegeben, konnten in 96 untersuchten Klonen 9 Mutanten identifiziert werden (Mutationsrate 9,4 %, Abbildung 3.7 B). Davon hatten 7 Mutanten die FLAG-Sequenz richtig eingebaut (HDR-Rate 77,8 %, Abbildung 3.7 B). Wurden Oligonukleotide mit zwei 30 bp langen homologen Bereichen (90 bp Gesamtlänge) als Donor verwendet, hing die Mutationsrate stark davon ab, in welcher Form sich die ODNs befanden: Mit einzelsträngigen ODNs wurde in beiden Orientierungen nur je eine Mutante identifiziert (Abbildung 3.7 B, „ss“). Lagen die komplementären ODNs aber zusammen un-, teilweise oder vollständig gepaart vor, konnten zwischen zehn und zwölf Mutanten generiert werden (Abbildung 3.7 B, „ds“). Präzise HDR-FLAG-Integrationen fanden sich allerdings nur in den Ansätzen, in denen die ODNs einzelsträngig in der nicht-PAM Orientierung vorlagen (Abbildung 3.7 B, „nicht-PAM“ & „Fw+Rv“). Damit bestätigt sich die im vorherigen Kapitel 3.2.1 beobachtete Polarität (Abbildung 3.6 B, „ODN PAM / nicht-PAM“). Einzelsträngige ODNs in der nicht-PAM-Orientierung werden besser als HDR-Substrat erkannt als in der komplementären Orientierung.

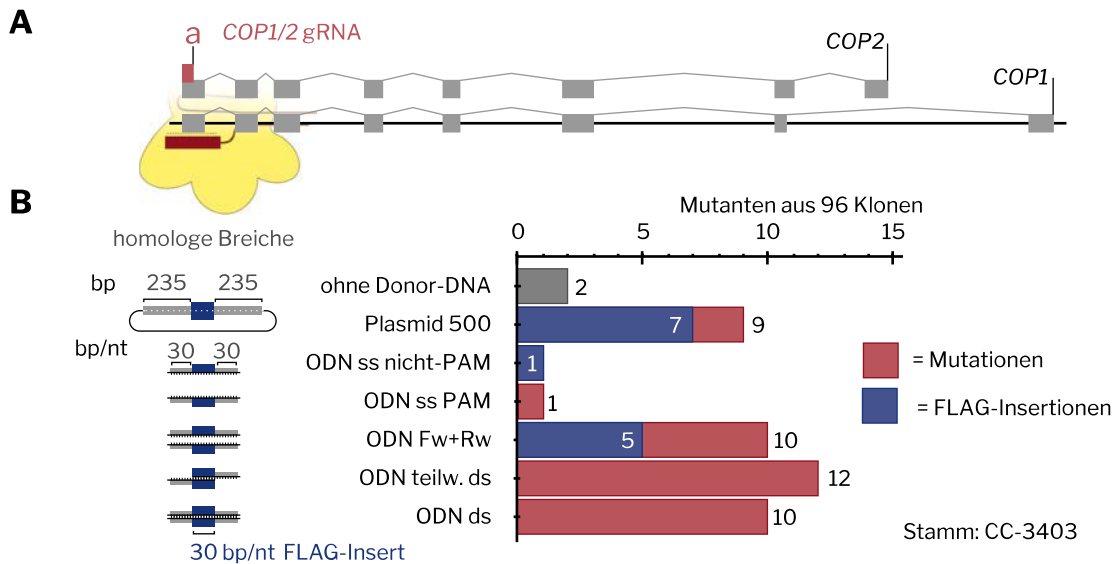


Abbildung 3.7: Geninaktivierung von *COP1/2* durch unterschiedliche Donorsubstrate.

A) Identifikation einer geeigneten Cas9-Zielsequenz im ersten Exon von *COP1/2* (*COP1/2*-a). **B)** Geninaktivierung von *COP1/2* mit unterschiedlichen Donorsubstraten. *Blaues Rechteck* = FLAG-Sequenz. *Graues Rechteck* = homologe Bereiche. *Plasmid 500* = Donor-Plasmid mit je 235 bp langen homologen Bereichen. *ODN* = Oligonukleotide mit 30 bp langen homologen Bereichen. *PAM* = ODNs sind in der Orientierung des PAM-Stranges. *nicht-PAM* = Orientierung des ODNs komplementär zum PAM-Strang. *Fw + Rv* = Zwei komplementäre ODNs wurden eingesetzt. *teilw. ds* = Zwei 60 bp ODNs überlappen sich nur in der FLAG-Sequenz. *ds* = Zwei komplementäre ODNs wurden zu doppelsträngiger DNA hybridisiert.

Die hier durch CRISPR/Cas9 generierten Mutanten demonstrieren, dass mit Cas9-RNPs Gen-Knockouts in *C. reinhardtii* hergestellt werden können. Der Vergleich unterschiedlicher Donor-DNAs zeigt, dass sich Oligonukleotide optimal als Donor-Substrat eignen, da sie einfach in der Handhabung sind, zu hohen Mutationsraten führen und präzise FLAG-Insertionen erlauben.

Auf diese Weise konnten Mutanten mit Disruptionen in zehn der 15 Photorezeptorgene (*COP1/2*, *ChR1*, *ChR2*, *COP5*, *COP6*, *COP8*, *COP11/12*, *aCRY*, *PHOT*, *UVR8*) und in weiteren zehn Genen anderer Funktion (*ARG7*, *RBP40*, *PBCP*, *PBCP-LIKE*, *SNRK2.2*, *PSR1*, *2-LOG*, *4-IPT*, *CAV2*, *CiliK*) erzeugt werden (Abbildung 3.8). Dies wurde mit verschiedenen Donor-Substraten (Plasmide, ODNs mit/ohne homologe/n Bereiche/n und gepaart/ungepaart) und in unterschiedlichen Stämmen (CC-125, CC-1826, CC-3403, CC-4530, CC-4533, SAG11-32b, SAG73.72) erreicht (Abbildung 3.8, „Donor-DNA“).

Bei diesen Experimenten zeigte sich noch einmal deutlich, dass die FLAG-Sequenz nur in wenigen Fällen korrekt – also unter Berücksichtigung der flankierenden homologen Bereiche – eingebaut wurde. Deshalb wurde in späteren Experimenten auf die homologen Bereiche verzichtet und nur die 30-36 bp lange FLAG-Sequenz verwendet (FLAG_{v2}). Da diese ODNs nicht an die Zielsequenz angepasst werden müssen, können sie als universelle ODNs für Geninaktivierungen benutzt werden. In einigen Fällen wurden auch diese FLAG_{v2}-ODNs

(ohne Verlust von Basenpaaren) korrekt an der vorhergesagten Schnittstelle eingebaut (Abbildung 3.8, „ChR1“, „ChR2“, „COP8“, „CAV2“).

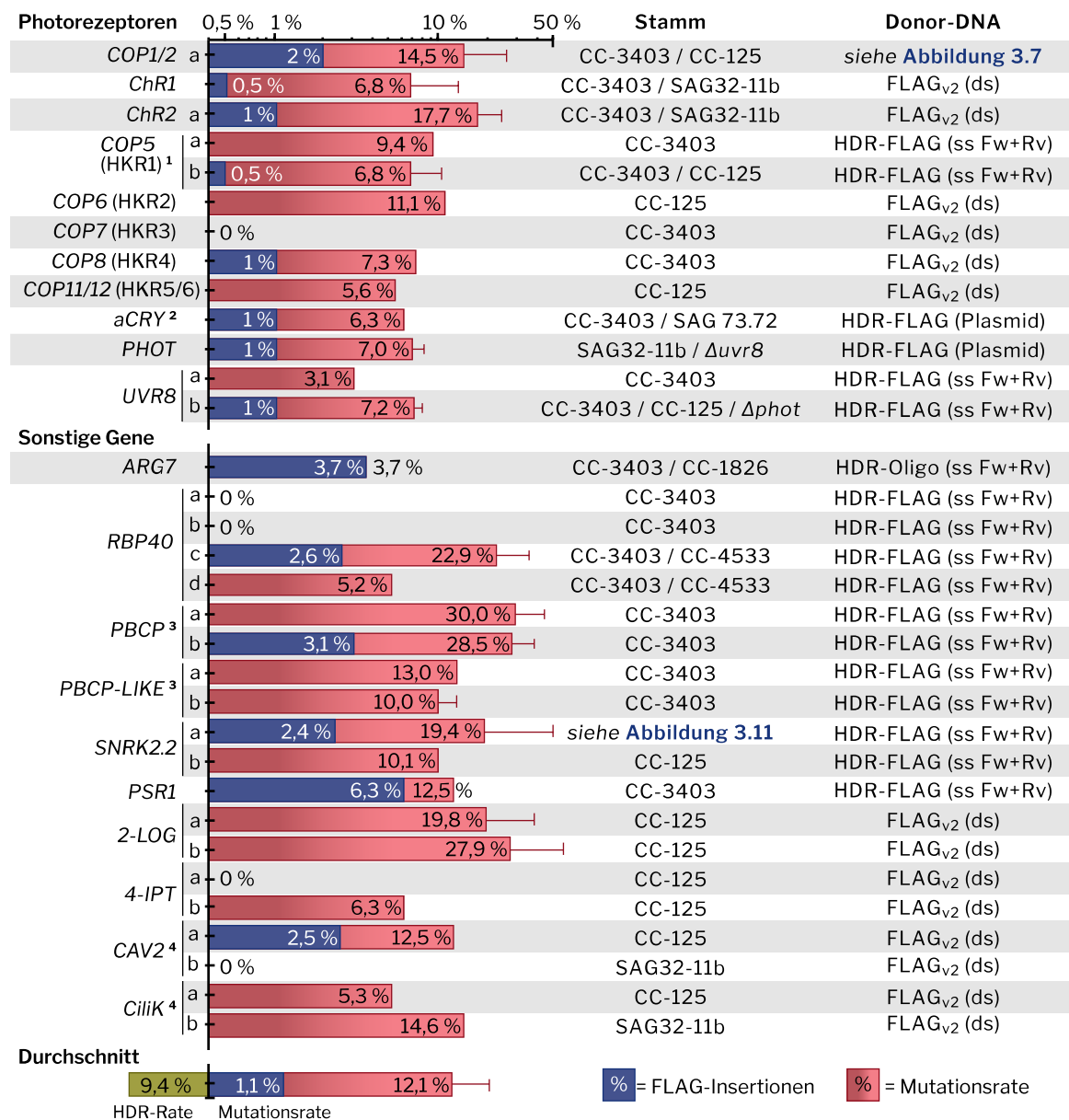


Abbildung 3.8: Geninaktivierung mittels Cas9-Ribonukleoproteinen (RNPs)

Mutationseffizienz verschiedener Zielgene und Zielsequenzen (a-d) unterteilt in Gesamtmutationsrate (rot) und reine FLAG-Insertionen (blau). Werte beziehen sich auf ein Experiment oder falls mit Fehlerbalken auf Durchschnittswerte mit Standardabweichung mehrerer Experimente (n = 1-4) mit der gleichen Zielsequenz. Zusätzlich ist angegeben, welcher Stamm (CC-Nummer) und welches Donor-Substrat verwendet wurden. *HDR-FLAG* = bezeichnet Donor-Substrate, in denen die FLAG-Sequenz von homologen Bereichen flankiert war. Bei Plasmiden sind die homologen Bereiche je 235 bp lang, bei ODNs je 30 bp. *ss Fw+Rv* = ODNs wurden einzelsträngig in beiden Orientierungen zugegeben. *FLAG_{v2}* = Es wurden universelle ODNs verwendet, die nur aus einer 30-36 bp langen FLAG-Sequenz bestehen ohne homologe Bereiche. *ds* = Zwei komplementäre ODNs wurden zu doppelsträngigen DNA Molekülen gepaart. ¹⁾ = Diese Experimente wurden von Dr. Irina Sizova durchgeführt (Greiner *et al.* 2017). ^{2&3} = Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Wenshuang Li² und Federica Cariti³ durchgeführt. ⁴ = Diese Experimente wurden im Zuge eines Studentenkurses von Francisca Boehning, Lisa Schneid, Maryam Baghi und Andrea Castro durchgeführt.

Auch die Herstellung von Doppelmutationen ist auf diese Weise möglich. So wurden die Deletionsstämme $\Delta uvr8$ und $\Delta phot$ erneut mit Cas9-RNPs transformiert, um die Stämme $\Delta uvr8/\Delta phot$ und $\Delta phot/\Delta uvr8$ zu erhalten (Abbildung 3.8, „*Phot/\Delta uvr8*“, „*UVR8/\Delta phot*“).

Im Durchschnitt lag die Mutationsrate bei 12,1 % und die Rate an präzisen FLAG-Integrationen bei 1,1 %. Das ergibt ein Verhältnis der FLAG-Integrationen zu allen Mutanten (HDR-Rate) von 9,4 %. Fünf der 33 in dieser Arbeit verwendeten gRNAs führten zu keiner Mutante, woraus sich im Umkehrschluss eine gRNA-Erfolgsrate von 85 % ergibt (Abbildung 3.8).

Zusammenfassend stellt dieses Protokoll somit eine robuste Methode dar, um Gene im Kerngenom von *C. reinhardtii* zu inaktivieren.

3.2.3 Einführung von Fluoreszenz- und Markerproteinen

Zur Klärung mancher biologischer Fragestellungen ist es nicht ausreichend, Gene zu inaktivieren, sondern notwendig, präzise Genveränderungen einzuführen. Beispielsweise ist COP2 eine Spleißvariante von COP1 und unterscheidet sich nur im letzten Exon. Um diese beiden Proteine biochemisch durch Antikörper zu unterscheiden, benötigt man eine spezifische Markierung an nur einem der beiden Proteine. Damit ließen sich beispielsweise Co-Immunopräzipitations-Assays durchführen oder untersuchen, ob sich die Lokalisation der beiden Proteine innerhalb der Zelle unterscheidet. Ein weiteres Anliegen unserer Arbeitsgruppe ist es, die unterschiedliche physiologische Rolle von ChR1 und ChR2 zu klären. Wie in Kapitel 3.1.5 gezeigt wurde, konnte unter sehr hohen Lichtstärken zwar eine Reizwahrnehmung durch ChR2 gemessen werden, jedoch schien die Inaktivierung von ChR2 im Stamm CC-3403 die Phototaxis nicht zu beeinträchtigen. Eine spezifische Markierung von ChR2 würde Aufschluss über die genaue Lokalisation und Expression im Vergleich zu ChR1 geben. Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden im Rahmen der von mir angeleiteten Masterarbeit von Erik Zschieschang Fluoreszenz- und Tag-Proteine in das *COP1*- und *ChR2*-Gen eingefügt. Als Tag-Proteine wurde der SNAP-Tag und das gelbe Fluoreszenzprotein *mVenus* benutzt (Nagai et al. 2002; Keppler et al. 2003). Das SNAP-Protein ist eine modifizierte O-6-Alkylguaninalkyltransferase (AGT), die es erlaubt, einen Fluoreszenzfarbstoff kovalent an sich zu binden. Um die Proteinfunktion nicht zu beeinträchtigen, wurde das Markerprotein von GS-Linkern flankiert (3x G₄S, Argos 1990). Eine geeignete Zielsequenz im *COP1*-Gen konnte nur im Abstand von 48 bp vor dem Stoppcodon identifiziert werden. Damit aber die komplette Proteinsequenz erhalten blieb, wurden diese 16 AS des C-Terminus vor dem GS-Linker eingefügt. Im *ChR2*-Gen waren es 30 bp bzw. 10 AS (Abbildung 3.9 A+B). Dieses Insert (C-Terminus + GS-Linker + SNAP/mVenus) wurde flankiert von je zwei homologen Bereichen mit 484 bp und 747 bp für *COP1* bzw. 620 bp und 747 bp für *ChR2* (Abbildung 3.9 A+B).

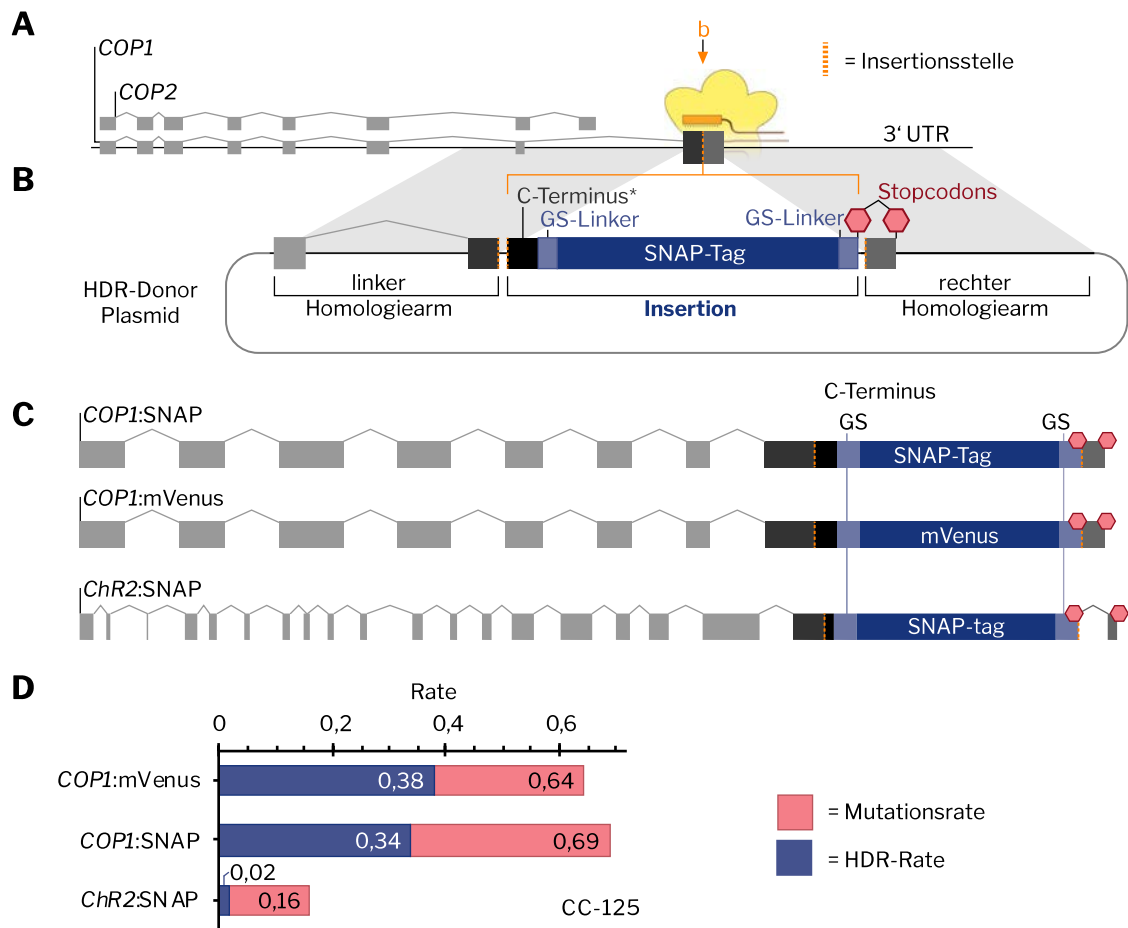


Abbildung 3.9: Einführung von Protein-Tags.

Diese Experimente wurden unter meiner Anleitung von Erik Zscheschang durchgeführt (Zscheschang 2018). **A**) Genkarte von *COP1/2* und Insertionsstrategie, um spezifisch *COP1* mit einem Reportergen (*SNAP-Tag*) zu markieren. Eine geeignete Zielsequenz wurde acht Aminosäuren vor dem C-Terminus identifiziert (*COP1/2-b*). Die fehlenden acht Aminosäuren wurden dem Reportergen vorangestellt. **B**) Struktur des Donor-DNA Fragments (Tabelle 31). **C**) Erwarteter Einbau der Reportergene (*SNAP-Tag*, *mVenus*) in *COP1* und *Chr2* nach obigem Schema. **D**) Ergebnisse und Insertionsraten der drei Konstrukte, unterteilt nach Mutationsrate aller Klone (rot) und solcher mit korrektem Einbau (blau).

Damit solche Donorplasmide in Zukunft einfacher kloniert werden können, etablierte Erik Zscheschang für unser Labor ein modulares Klonierungssystem mit „zyklische Ligationsreaktion“ (engl.: *cycled ligation assembly*, Roth et al. 2014; Zscheschang 2018). Hier können in einem Ansatz bis zu zwölf DNA-Fragmente zu einem Molekül zusammengesetzt werden, ohne dass Basen an den Verknüpfungsstellen hinzugefügt oder entfernt werden müssen. Die Assemblierung erfolgt mithilfe kurzer Linker-Oligonukleotide (SOCs), die die zwei zu verknüpfenden DNA-Fragmente überlappen und damit in Position halten. Eine hitzestabile Ligase (hier: *Taq-Ligase*) kann nun die so positionierten Fragmente verknüpfen. Für die Donorplasmide werden vier Fragmente benötigt: ein leerer Vektor, der linke und rechte homologe Bereich und das zu inserierende Fusionsprotein (hier: *mVenus* bzw. *SNAP-*

Tag). Da keine Überhänge oder Schnittstellen berücksichtigt werden müssen, ist das Insert universell in zukünftigen Donorplasmiden einsetzbar.

Zellen des CC-125 Stamms wurden mit Cas9-RNPs gegen den C-Terminus von *COP1* und *Chr2*, dem Markerplasmid pHyg und den Donorplasmiden (*pHDR-COP1-SNAP*, *pHDR-COP1-mVenus*, *pHDR-ChR2-SNAP*) durch Elektroporation transformiert. Je 96 Hygromycin-resistente (Hyg^R)-Klone wurden auf Insertionen überprüft. Die Klone wurden mit einer Locus- und FLAG-PCR untersucht. Für *COP1* zeigte sich bei 67 % (*COP1-mVenus*) bzw. bei 69 % (*COP1-SNAP*) der Klone eine Mutation an der Zielsequenz, wobei ungefähr die Hälfte davon (56 % bzw. 49 %) die korrekte Insertion des Markergens besaßen (Abbildung 3.9 D, „*COP1*“). Die andere Hälfte zeigte falsche zusätzliche Integrationen von beispielsweise dem Markerplasmid oder eine Verdoppelung der homologen Bereiche. Bei *Chr2* waren 16 % der Klone mutiert. Unter diesen fanden sich zwei Klone mit der richtigen Integration des *SNAP*-Tags (Abbildung 3.9 D, „*Chr2*“).

Diese Ergebnisse zeigen, dass mittels Cas9-RNPs und entsprechender Donorplasmide präzise Genveränderungen wie beispielsweise Geninsertionen von 680 bp (für den SNAP-Tag) und 941 bp (für mVenus) durchgeführt werden können.

3.3 Verbesserung der homologen DNA-Reparatur

In Kapitel 3.2 wurde gezeigt, dass Cas9-RNPs gezielte Gen-Veränderungen erlauben, jedoch wurden auch deren Limitationen sichtbar. So lag die durchschnittliche Mutationsrate zwar bei 12,2 % und reichte, um regelmäßig Geninaktivierungen zu finden. Allerdings zeigten nur durchschnittlich 1,1 % aller vorselektierten Klone eine präzise FLAG-Insertion durch Homologie-vermittelte DNA-Reparatursysteme (Abbildung 3.8). Um also reproduzierbare Experimente zum präzisen Einbringen oder Austauschen von Genen oder kurzen Sequenzabschnitten durchzuführen, muss die HDR-Rate verbessert werden. Eine Erhöhung um etwa das Zehnfache würde die zuverlässige Herstellung solcher Mutanten gewährleisten. Dies könnte entweder durch eine Verbesserung der allgemeinen Mutationsrate oder des Anteils an FLAG-Mutanten erreicht werden.

Um die Transformationsbedingungen in dieser Hinsicht zu verbessern, bedurfte es einer Methode, die das Auslesen der HDR-Rate in einer großen Anzahl von Klonen ermöglichte. Das etablierte *aphVIII*-Testsystem (Abschnitt 3.1.1) erlaubt zwar das einfache Feststellen der absoluten Anzahl an HDR-Ereignissen, allerdings geht hier die Information verloren, wie viele Mutationen insgesamt stattgefunden haben, da Zellen, in denen das defekte *aphVIII**-Gen fehlerhaft repariert wurde, nicht überlebensfähig sind. Deshalb wurde das „Blau-Grün“ Reportersystem etabliert, das Mutationen sichtbar macht, die sowohl durch die homologe Reparatur als auch durch die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) entstanden sind.

3.3.1 Analyse der Transformationsbedingungen durch den Blau-Grün-Test

Der Blau-Grün-Test basiert auf der Umsetzung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylsulfat (X-SO₄) zu Indigoblau. Diese Reaktion kann durch das natürlicherweise in *C. reinhardtii* vorkommende Enzym Arylsulfatase katalysiert werden. Hierbei wird die Sulfatgruppe abgespalten und je zwei Indoxyl-Moleküle oxidiert zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo. Die Expression der Arylsulfatase wird in *C. reinhardtii* streng reguliert und nur bei Sulfatmangel aktiviert. Die Regulation erfolgt durch mehrere *SNF1*-verwandte Proteinkinasen (*SNRKs*). Durch Inaktivierung des Repressors *SNRK2.2* kommt es zu einer konstitutiven Expression der Arylsulfatase – auch wenn die Zellen in sulfathaltigem TAP-Medium kultiviert werden (Abbildung 3.10 A). Da die Arylsulfatase natürlicherweise sekretiert wird, kann deren Aktivität im Überstand der Zellkultur oder direkt auf Agarplatten detektiert werden (Abbildung 3.10 B+D). Mutationen im *SNRK2.2*-Gen, die das Protein inaktivieren, führen also zur konstitutiven Expression der Arylsulfatase, die durch einen Farbumschlag mit dem Substrat X-SO₄ festgestellt werden kann.

Um dies zu testen, wurde eine Cas9-Zielsequenz im ersten Exon von *SNRK2.2* ausgewählt und *C. reinhardtii*-Zellen des Stamms CC-3403 mit dem entsprechenden RNP, dem *ARG7*-Plasmid zur Selektion und einem Donor-Oligonukleotid transformiert. Von 96 zufällig gepickten Arg⁺-Klonen zeigten sieben Klone eine fehlende WT-PCR-Bande (Abbildung 3.10 B). Nach Färbung der 96 Klone mit dem Substrat X-SO₄ konnte bei fünf Klonen ein blauer Farbumschlag detektiert werden (Abbildung 3.10 C). Alle fünf Klone stimmten mit den durch PCR-Analyse detektierten Klonen überein. In weiteren 180 Klonen fanden sich zehn blaue Kolonien, wovon sich in neun Klonen eine Mutation mittels PCR bestätigen ließ (Daten nicht gezeigt). In Kontrollexperimenten mit RNPs gegen ein anderes Gen konnte keine Blaufärbung in mehreren hundert angefärbten Klonen festgestellt werden.

Also eignet sich *SNRK2.2* als Reportergen, um mithilfe des Blau-Grün-Tests HDR- und NHEJ-Mutationen sichtbar zu machen.

Unter Zuhilfenahme des Blau-Grün-Assays ließen sich nun die Parameter für Cas9-RNP-Transformationen weiter optimieren. Folgende Bedingungen wurden untersucht (Abbildung 3.10 D+F): a) Synchronisierte Wachstumsbedingungen, b) Hitze-Schock, c) Impulslänge der Elektroporation, d) Konzentrationen der Cas9 RNPs, e) Konzentration der Insertions-ODNs und f) Konzentration des Markerplasmids.

Zellen des Stamms CC-125 wurden mit einem Cas9-RNP gegen das *SNRK2.2*-Gen, einem Insertions-ODN und einem Selektions-Markerplasmid transformiert. Nachdem die Zellen zu sichtbaren Kolonien herangewachsen waren, wurde das X-SO₄-Substrat auf die Selektionsagarplatten gesprüht. Nach 24 h war bereits eine deutliche Blaufärbung zu erkennen (Abbildung 3.10 E). Zur Auswertung wurden zwei Kennzahlen berücksichtigt: die Transformationseffizienz und die Mutationseffizienz. Die Transformationseffizienz ergibt sich durch die Anzahl aller Antibiotika-resistenten Kolonien und dient als Maß dafür, wie

gut die Zellen generell transformiert wurden. Die Mutationsfrequenz ist das Verhältnis der blauen Kolonien, also aller mutierten Kolonien zur Gesamtzahl der Kolonien (Abbildung 3.10 F, „rote Linie“).

Standardmäßig wurden die Zellen unter synchronisierten Wachstumsbedingungen, also unter wechselnden Lichtverhältnissen (14 h Licht bei 25 °C, 10 h Dunkelheit bei 18 °C) kultiviert, da bei vergleichbaren Experimenten mit plasmidcodierten Zinkfinger-nukleasen unter diesen Bedingungen höhere Mutationsraten beobachtet werden konnten (Sizova *et al.* 2013). Diese Erhöhung konnte hier nicht bestätigt werden. Zellen, die unter Dauerlicht angezogen wurden, zeigten sogar eine leicht erhöhte Mutationsrate im Vergleich zu Zellen unter synchronisierten Wachstumsbedingungen (Abbildung 3.10 F, „a“). Wurde der Hitzeschock weggelassen, verringerte sich die Anzahl der Gesamtkolonien auf 30 % und die Mutationsfrequenz halbierte sich von 41 % auf 21 % (Abbildung 3.10 F, „b“). Auch eine Verkürzung oder Verlängerung des ersten 8 ms 300 V Elektroporationspulses um je 3 ms verringerte die Anzahl der Gesamtkolonien auf 35 % bzw. 40 % und reduzierte die Mutationsfrequenz von 41 % auf 20 % bzw. 15 % (Abbildung 3.10 F, „c“). Die Cas9-RNP-Menge wurde von 0 bis 30 pmol variiert, wobei in vorherigen Experimenten 12 pmol pro Elektroporation benutzt wurden. Dabei zeigte sich, dass über den Bereich von 3-12 pmol etwa die gleiche Mutationsfrequenz von 15-17 % erreicht wurde. Erst bei Konzentrationen ≥ 15 pmol RNP kam es zu einer Reduktion der Mutationsfrequenz auf < 3 % (Abbildung 3.10 F, „d“). Die Menge an eingesetzten FLAG-ODNs hatte einen starken Einfluss auf die Transformations- und Mutationsrate. Je mehr ODN-Moleküle (0, 1, 5, 20, 100 pmol) eingesetzt wurden, desto höher war die Transformationseffizienz (0, 0, 28, 64, 112 Kolonien). Im Gegensatz dazu war die Anzahl der blauen Kolonien nicht ansteigend (0, 0, 12, 24, 8), wodurch sich mit höheren ODN-Konzentration eine niedrigere Mutationsrate ergab (Abbildung 3.10 F, „e“). Einen vergleichbaren Einfluss hatte die Menge des eingesetzten Markerplasmids: Eine höhere Konzentration des Markerplasmids führte zu mehr Gesamtkolonien, während die Mutationsfrequenz abnahm (Abbildung 3.10 F, „f“). Zur effizienten Generation von Mutanten-Stämmen wurde hier entsprechend ein Kompromiss gefunden: Es wurde eine Bedingung gewählt, bei der eine möglichst hohe Mutationseffizienz erzielt und genug Kolonien generiert werden konnten, um Mutanten zu isolieren. Als praktikabel haben sich mind. 50 Kolonien pro Elektroporation erwiesen. Obwohl mit 5 pmol ODNs die Mutationsrate gegenüber den Standardbedingungen um 5 % erhöht werden konnte, empfahl sich die Verwendung von 20 pmol Oligos, um einen Abfall der Transformationseffizienz (-56 %) zu vermeiden (Abbildung 3.10 F, „e“). Bei dem Markerplasmid stellte sich eine Erhöhung von 0,3 μg auf 0,5 μg jedoch als sinnvoll heraus, da sich hier die Transformationseffizienz verdoppelte und die Mutationseffizienz um 19 % stieg (Abbildung 3.10 F, „f“).

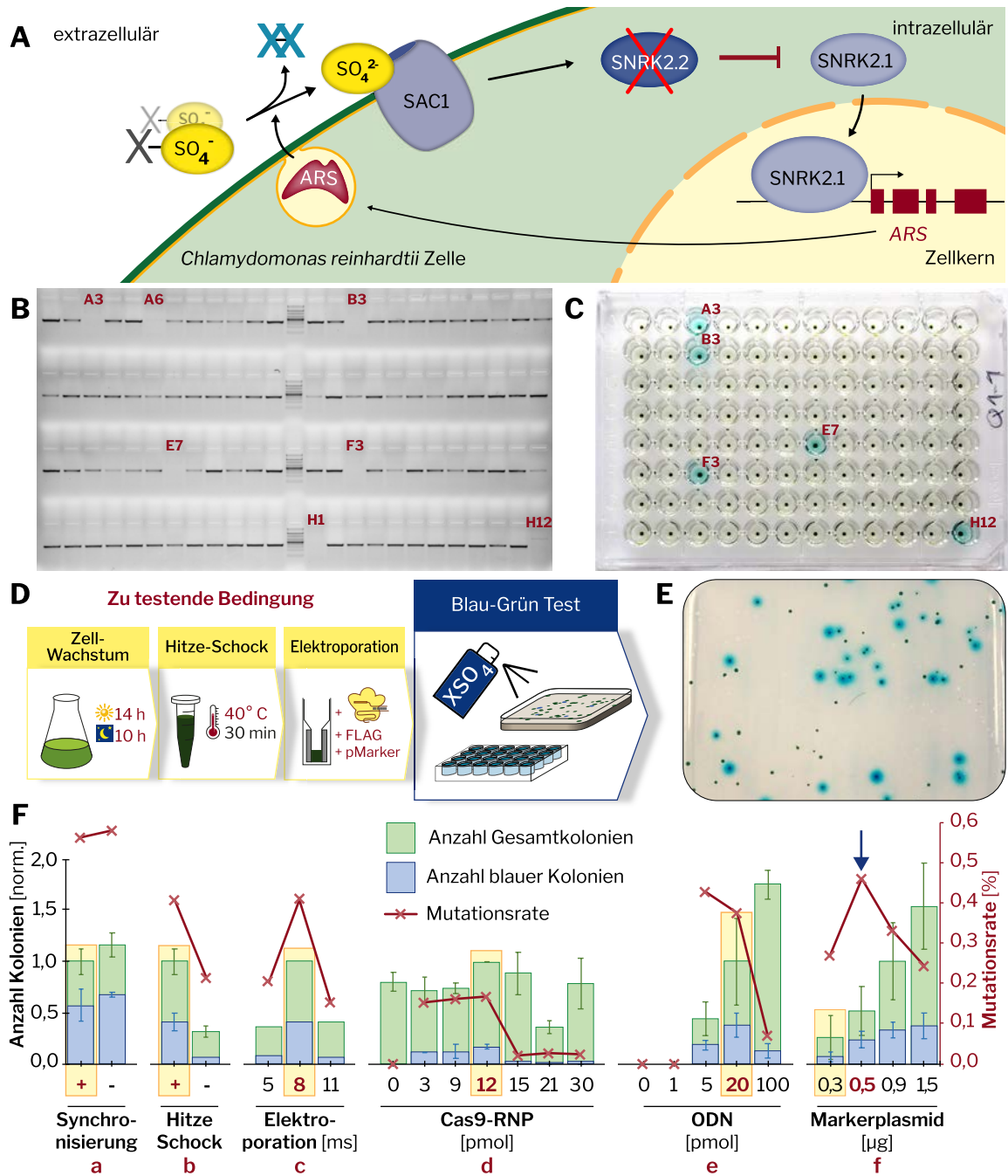


Abbildung 3.10: Der Blau-Grün-Test zur schnellen Identifikation von Mutanten.

A) Inhibierende Regulation der Arylsulfatase(ARS)-Expression durch SAC1, SNRK2.2 und SNRK2.1 in Abhängigkeit von der Sulfat(SO_4^{2-})-Konzentration im Medium. Bei Inaktivierung des SNRK2.2-Gens wird Arylsulfatase exprimiert, die dem Chromogen 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylsulfat (X-SO_4) die Sulfatgruppe abspalten kann, wobei der indigoblaue Farbstoff entsteht. **B)** Etablierung des Blau-Grün-Tests: 96 zufällig gepickte Klone werden per Locus-PCR auf Mutationen untersucht. Fehlende PCR-Banden deuten auf Mutationen hin (rote Beschriftungen). **C)** Dieselben 96 Klone wurden mit dem X-SO_4 Substrat angefärbt. **D)** Schematischer Ablauf des Blau-Grün-Tests. Eine Cas9-RNP Transformation mit der Zielsequenz im SNRK2.2-Gen wird unter der zu testenden Bedingung durchgeführt. **E)** Klone können direkt auf der Agar-Platte mit dem X-SO_4 Substrat besprüht und dadurch angefärbt werden. **F)** Optimierung der Transformationsbedingungen. Die bis dahin verwendeten Standardbedingungen sind gelb umrahmt. Aufgetragen sind die Anzahl der gesamten Pm^R -Kolonien (grüne Balken) und blau gefärbte Kolonien (blaue Balken) normalisiert zur Standardbedingung. Das Verhältnis der blauen Kolonien zu allen Kolonien, also die Mutationsfrequenz, ist auf der Sekundärachse aufgetragen (rote Linien). Zukünftig verwendete Idealbedingungen sind rot/fett markiert.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Blau-Grün-Test die bereits etablierten Transformationsbedingungen für Cas9-RNPs mit Ausnahme der Menge an Markerplasmids bestätigt bzw. diese durch Weglassen des Belichtungsrythmus vereinfacht wurden.

3.3.2 Analyse der Homologie-vermittelten Reparatur

Im vorherigen Kapitel wurde zur Auswertung nur die Anzahl der *SNRK2.2*-Mutanten berücksichtigt. Die Art der Mutationen hingegen fand keine Berücksichtigung. Um die Mutationsart festzustellen, wurden verschiedene motile Stämme unter den optimalen Bedingungen transformiert und mit dem Blau-Grün-Test selektiert. Dabei wurden alle blauen Klone zusätzlich durch eine Locus-PCR untersucht und Insertionen, die durch eine Größenänderung auf eine korrekte Insertion der FLAG-Sequenz hindeuteten, sequenziert (Abbildung 3.11 A). Damit ließen sich die blauen Klone in die Kategorien „korrekte FLAG-Integration“, „weitere Insertionen“ (z. B. durch mehrfache Integration des HDR-ODNs oder des Markerplasmids), „keine PCR-Bande“ (durch z. B. ein sehr großes Insert) und „WT“ (z. B. durch Punktmutationen oder Mischkolonien mit WT) einteilen.

In fünf Ansätzen wurde in vier unterschiedliche Stämme die *SNRK2.2*-gRNA transformiert und insgesamt 1504 Antibiotika-resistente Klone mit dem Blau-Grün-Test analysiert. 303 der Transformanten (19 %) zeigten eine Blaufärbung und 35 Transformanten (2,2 %) integrierten das FLAG-Insert ohne Fehler (Abbildung 3.11). 12,1 % aller blauen Kolonien zeigten also die präzise Integration der FLAG-Sequenz im *SNRK2.2*-Gen (Abbildung 3.11 B). Dies bestätigt in etwa die beobachtete HDR-Rate aus Kapitel 3.2.2 (9,4 %, Abbildung 3.8). Unter den restlichen blauen Kolonien fanden sich in 24,7 % der Mutanten zusätzliche Insertionen und bei 44,3 % der Klone entstand kein PCR-Produkt, weil das Insert zu groß war, um amplifiziert zu werden. 18 % der Klone zeigten eine WT-Bande (Abbildung 3.11 B).

Da es zum Teil große physiologische Unterschiede zwischen den „WT“-Stämmen in *C. reinhardtii* gibt, wurde die HDR-Rate in den Stämmen CC-125, CC-3403, CC-4350 und CC-4533 analysiert. Es zeigte sich, dass die HDR-Rate in allen untersuchten WT-Stämmen ähnlich hoch ist (12 ± 2 %, Abbildung 3.11 C). Anders als beispielsweise die Phototaxis oder der Chlorophyllgehalt ist die DNA-Reparatur in diesen Stämmen offensichtlich konserviert.

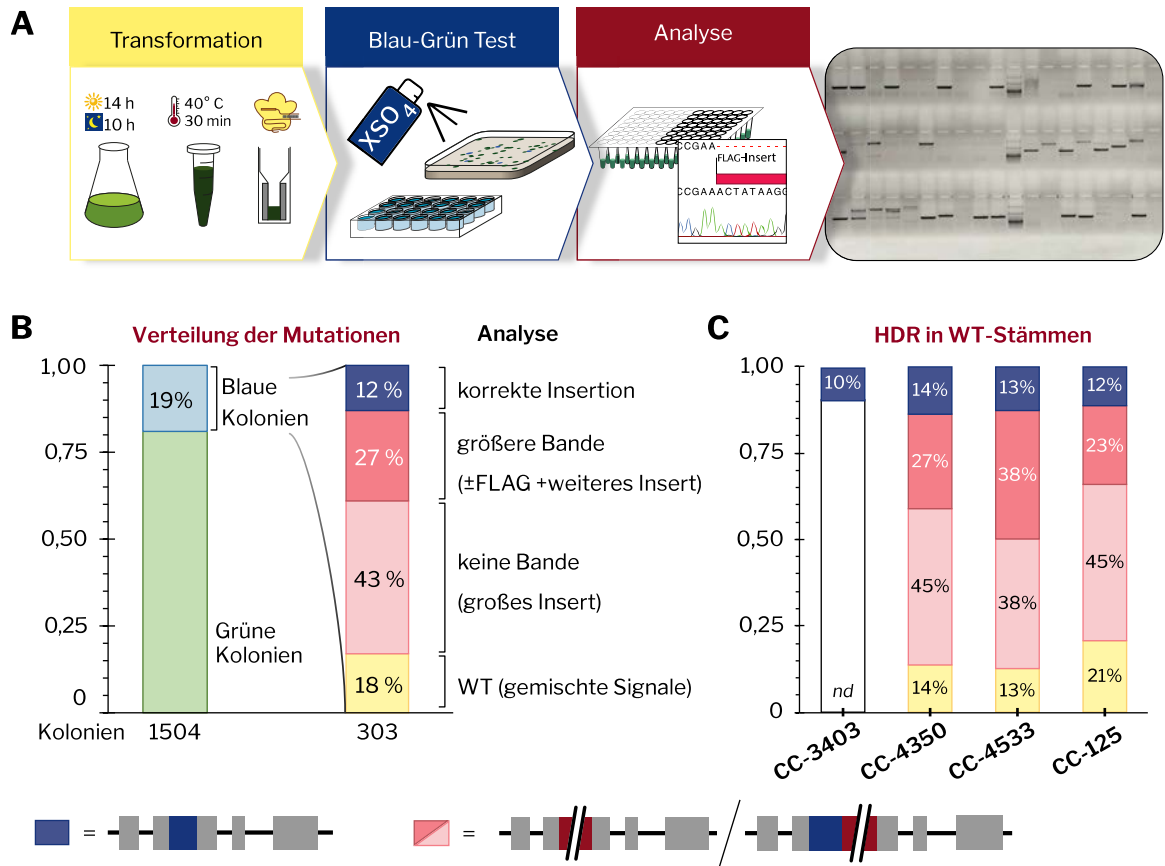


Abbildung 3.11: Analyse der Homologie-vermittelten Reparatur (HDR).

A) Experimenteller Ablauf: Blaue Zellen werden auf die Art der Mutation analysiert. Richtige Integrationen werden per Sequenzierung bestätigt. **B)** Analyse der Mutationen nach dem Blau-Grün-Test. Durchschnitt aller Stämme. **C)** Verteilung der Mutationen in unterschiedlichen *C. reinhardtii*-Stämmen. nd = wurde nicht untersucht.

Mit dem Blau-Grün-Test konnte ein einfaches Verfahren zur Feststellung von Mutanten etabliert werden. Indem nur gefärbte Kolonien auf die Art der Mutationen hin analysiert wurden, konnte die genaue HDR-Rate einer großen Anzahl an Kolonien effizient ermittelt und unter verschiedenen Bedingungen verglichen werden. Diese ersten Untersuchungen belegen, dass der Blau-Grün-Test ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung von Transformationsbedingungen und deren Einfluss auf die HDR-Rate ist.

Insgesamt ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen das CRISPR/Cas9-System für die Grünalge *C. reinhardtii* zu etablieren und ein zuverlässiges und robustes Protokoll zur gezielten Generation von Mutantenstämmen zu entwickeln.



4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Zinkfinger- und CRISPR/Cas9-basierte Methoden etabliert, die es ermöglichen, Gene im Kerngenom von *C. reinhardtii* zu inaktivieren und zu modifizieren. Cas9/gRNA-Ribonukleoproteine (RNPs) bieten eine effiziente Möglichkeit, die Nuklease an neue Zielsequenzen anzupassen. Die Effizienz, mit der Gene mittels Cas9-RNPs inaktiviert wurden, lag bei durchschnittlich 12,2 % (Abbildung 3.7) und liegt somit hoch genug, um Gen-Editierungen als Standardmethode in *C. reinhardtii* durchzuführen. Im Folgenden werden die wichtigsten methodischen Parameter herausgearbeitet und Protokoll-Varianten besprochen. Außerdem werden die genauen Unterschiede zu bestehenden Transformationsprotokollen in *C. reinhardtii* erläutert und zukünftige Verbesserungsmöglichkeiten diskutiert. Abschließend wird ein Überblick der generierten Photorezeptor-Mutanten gegeben und im Ausblick dargestellt, welche physiologischen Untersuchungen mit den generierten Stämmen durchgeführt werden könnten.

4.1 Wichtige Parameter für Experimente mit Cas9-RNPs in *C. reinhardtii*

Zur erfolgreichen Genmodifikation durch Cas9/gRNA-RNPs sind folgende Schritte zu beachten:

l) Die Kultivierung von *C. reinhardtii*-Zellen

Die Wachstumsbedingungen der Zellen üben einen großen Einfluss auf die Effizienz der Transformation aus. Die starke Abhängigkeit der Transformationseffizienz von der Zelldichte der Kultur wurde bereits in den ersten Transformationen von *C. reinhardtii*-Zellen beobachtet (Kindle 1990). Auch in den Experimenten dieser Arbeit wurde eine hohe Variabilität (20-200 Kolonien pro Elektroporation) der Transformationseffizienz beobachtet, die wahrscheinlich auf die Anzuchtbedingungen zurückzuführen ist. Es ist nicht nur die Zelldichte am Tag der Transformation ausschlaggebend, sondern das Wachstum der Zellen in den Tagen bzw. Wochen davor. Die Algenkultur sollte über einen Zeitraum von mind. 5-10 Tagen durch Verdünnen der Kultur im Bereich des exponentiellen Zellwachstums gehalten werden (Methoden 2.3.3).

Entgegen den Experimenten von Sizova *et al.* (2013) mit Plasmid-basierten ZFNs zeigte ein Wachstum der Algenzellen unter einem Tag-Nacht-Lichtrhythmus mit Cas9-RNPs keine erhöhte Mutationsrate gegenüber der Anzucht unter Dauerlicht (Abbildung 3.10 E). Eventuell sind Unterschiede nur bei schwachen Nukleasen messbar. Eine Synchronisation der

Zellkultur könnte also bei gRNAs mit niedriger Effizienz zu besseren Ergebnissen führen. Dies wurde in dieser Arbeit aber nicht untersucht.

II) Das Design neuer gRNAs

Die Effizienz der Nuklease, einen Doppelstrangbruch auszulösen, ist eine maßgebende Voraussetzung für eine erfolgreiche Genmodifikation. Starke Unterschiede in der Bindeaktivität verschiedener gRNAs wurden bereits bei der ersten Verwendung der Cas9-Nuklease für gentechnische Anwendungen erkannt (Cong *et al.* 2013; Mali *et al.* 2013). Deshalb wurden in den letzten Jahren Modelle entwickelt, um die Effizienz neuer gRNAs vorauszusagen. Dazu wurden Zellen mit gRNA-Bibliotheken transformiert und deren Aktivität mittels Hochdurchsatzsequenzierung bestimmt (Doench *et al.* 2014, 2016; Wang *et al.* 2014; Moreno-Mateos *et al.* 2015; Xu *et al.* 2015a). Aus den experimentellen Aktivitätsdaten werden anhand von Sequenz, GC-Gehalt und Sekundärstrukturen Modelle für effiziente gRNAs aufgebaut. Die so entwickelte Gewichtung von Zielsequenzen wird von verschiedenen Online-Tools, wie z. B. *CRISPR-P* (Liu *et al.* 2017), *E-CRISP* (Heigwer *et al.* 2014), *CCTOP* (Stemmer *et al.* 2015) oder *IDT-DNA* (www.idtdna.com) zusammen mit einer Suche nach potenziellen sekundären und unspezifischen Schnittstellen zu einer gRNA-Bewertung verarbeitet („gRNA-Score“). Tatsächlich wurde mehrfach gezeigt, dass bei Verwendung von Zielsequenzen mit hohen Punktzahlen die Wahrscheinlichkeit steigt, aktive gRNAs auszuwählen (Haeussler *et al.* 2016). Dennoch ist ein hoher gRNA-Score immer noch keine Garantie, dass die gRNA auch im Experiment eine hohe Aktivität zeigt. Haeussler *et al.* (2016) stellen in ihrer Metastudie fest, dass die aktuellen Modelle nur etwa 40 % der Variation zwischen unterschiedlichen Zielsequenzen erklären können. Das liegt zum Teil daran, dass die gemessenen Aktivitäten der gRNAs stark von den jeweiligen experimentellen Rahmenbedingungen abhängen und dadurch verzerrt werden. Beispielsweise werden in Ansätzen, in denen die gRNAs *in vivo* von Plasmiden mithilfe eines U6-Promoters transkribiert werden, Zielsequenzen angereichert, die für eine hohe Expression durch diesen Promoter sorgen (z. B. ein 5′-„G“; Doench *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014). Werden die gRNAs *in vitro* durch eine T7 Polymerase hergestellt, werden andere Sequenzen bevorzugt transkribiert (Gagnon *et al.* 2014; Moreno-Mateos *et al.* 2015). Außerdem nehmen die Art der Aktivitätsmessung und der Wirtsorganismus ebenfalls Einfluss auf das Bewertungsmodell. Bisher wurden solche Daten nur mit menschlichen Zellen (Doench *et al.* 2014), in Mäusen (Haeussler *et al.* 2016), im Zebrafisch (Moreno-Mateos *et al.* 2015), in *Drosophila* (Ren *et al.* 2014) und mit *C. elegans* (Farboud & Meyer 2015) erhoben. Für Pflanzen oder Algen existieren keine solchen Daten, weshalb diese gRNA-Scores nur bedingt auf Transformationen mit Cas9-RNPs in *C. reinhardtii* anwendbar sind.

Um zu überprüfen, welcher gRNA-Score am besten die Aktivität für Cas9-RNP Experimente in *C. reinhardtii* vorhersagt, wurden die in dieser Arbeit gemessenen Aktivitäten mit den jeweiligen gRNA-Scores von *CRISPR-P*, *E-CRISP*, *CCTOP* und *IDT-DNA* verglichen (Abbildung 4.1 A). Der Grad der Abhängigkeit der gRNA-Scores von der experimentellen Aktivität kann z. B. über eine Spearman-Korrelation dargestellt werden,

wobei der Wert 0 anzeigt, dass es keine Korrelation zwischen den untersuchten Gruppen gibt und bei 1 bzw. -1 eine direkte bzw. indirekte Korrelation besteht.

Für keinen der vier Algorithmen lässt sich eine signifikante Korrelation zur Aktivität feststellen ($R^2 = -0,20 - +0,14$; Abbildung 4.1 B). Hier muss berücksichtigt werden, dass bereits alle gRNAs anhand eines überdurchschnittlich hohen gRNA-Scores ausgewählt wurden (meist *CRISPR-P*). Häufig wird empfohlen, dass am 3'-Ende der gRNA die Base „G“ vorkommen soll (Wilson *et al.* 2018). Allerdings lässt sich auch hier kein Zusammenhang zur gemessenen Aktivität feststellen (Abbildung 4.1, „G“). Interessanterweise erzeugt der GC-Gehalt der Zielsequenz die größte (negative) Korrelation (-0,42; Abbildung 4.1 B). Alle vier gRNAs mit einem GC-Gehalt über 70 % zeigten keine oder nur sehr niedrige Aktivität (Abbildung 4.1 A). Ein hoher GC-Gehalt über 65 % sollte also vermieden werden. Insgesamt lässt sich dennoch feststellen, dass 28 der 35 gRNAs (80 %), die in dieser Arbeit mithilfe von gRNA-Scores ausgewählt wurden, zu Gen-Knockouts geführt haben.

Die aktuellen gRNA-Scores bieten eine gute Hilfe zur Vorauswahl der Zielsequenz, aber solange es keine Modelle für Cas9-RNPs in Algen – oder zumindest Pflanzen – gibt, sind die Vorhersagen nur bedingt auf Experimente in *C. reinhardtii* anwendbar.

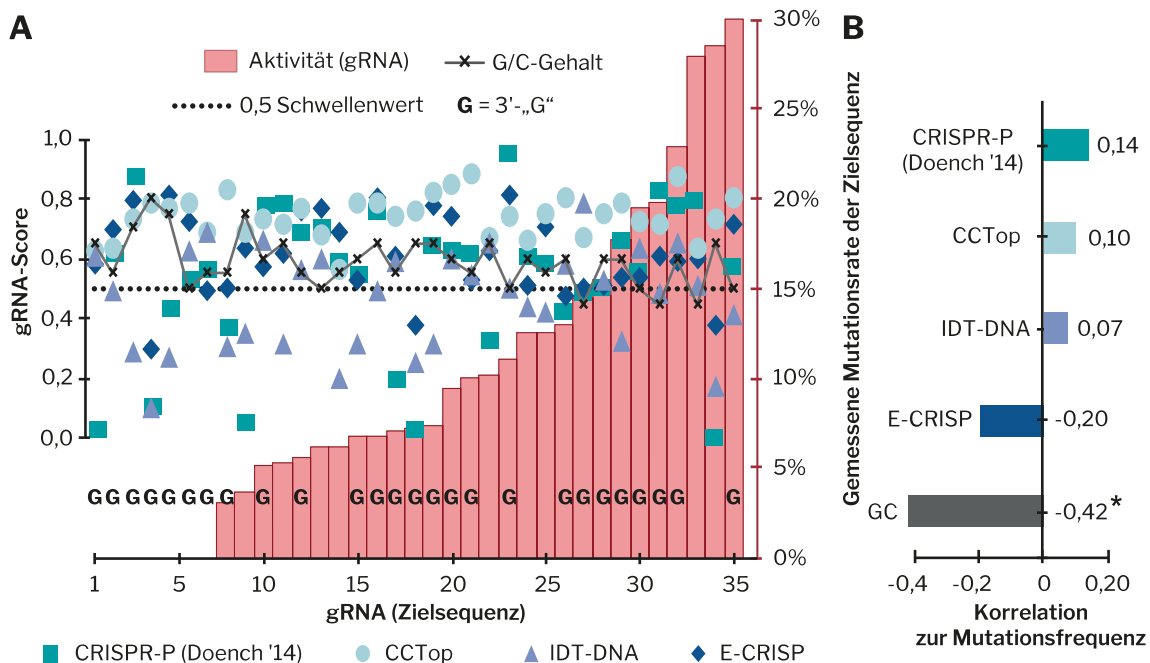


Abbildung 4.1: Evaluierung von Cas9-gRNA Vorhersage-Algorithmen für *C. reinhardtii*.

A) Die 35 in dieser Arbeit verwendeten gRNAs sind nach ihrer (experimentell) gemessenen Mutationsrate sortiert (rote Balken). Die Vorhersagen (0-1) der Algorithmen *CRISPR-P* (■ Liu *et al.* 2017), *E-CRISP* (◆ Heigwer *et al.* 2014), *CCTOP* (● Stemmer *et al.* 2015) und *IDT-DNA* (▲ www.idtdna.com) sind für jede gRNA eingetragen. Der GC-Gehalt der 20-bp gRNA ist als schwarze Linie eingezeichnet. Ein „G“ steht für die Base „G“ am 3'-Ende. **B)** Korrelationskoeffizienten nach *Spearman* für die vier verwendeten Algorithmen und den GC-Gehalt der gRNA zur experimentellen Aktivität der gRNAs. * = $p < 0,05$.

III) Die optimale Donor-DNA

Die Zugabe einer Donor-DNA bestimmt die Art der Mutation, die durch den induzierten Doppelstrangbruch entsteht. Um das Screening nach Mutanten zu vereinfachen, wurde eine 30-40 bp lange FLAG-Sequenz an der Zielsequenz inseriert (Abbildung 3.3). Dazu wurde eine Donor-DNA verwendet, die durch Homologie-vermittelte DNA-Reparatursysteme eingebaut wurde.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Donor-DNA-Moleküle verglichen. Die höchste HDR-Rate wurde mit Donor-Plasmiden mit langen (>250 bp) homologen Bereichen erzielt (Abbildung 3.6 und 3.7). Da die Herstellung des Donor-Plasmids aber entweder eine Klonierung oder eine Gensynthese voraussetzt, wurde die Verwendung von Donor-Oligonukleotiden mit 30 bp langen homologen Bereichen bevorzugt. Eine Verlängerung der homologen Bereiche von 30 bp auf 50 bp führte zu keiner Verbesserung hinsichtlich der HDR-Rate (Abbildung 3.6). Allerdings wurde beobachtet, dass einzelsträngige ODNs in der nicht-PAM-Orientierung zu 2,8-mal höheren HDR-Raten führten als in der komplementären Orientierung (Abbildung 3.6, „ODN nicht-PAM“). Die höchste HDR-Rate wurde mit einer Mischung aus einzelsträngigen ODNs beider Orientierungen erzielt (Abbildung 3.7, „ODN Fw+Rv“).

In vergleichbaren Studien an menschlichen Zellen zeigen Richardson *et al.* (2016), dass einzelsträngige Oligonukleotide in der nicht-PAM-Orientierung mit 91 und 36 bp langen – also asymmetrischen – homologen Bereichen etwa doppelt so hohe HDR-Raten hervorrufen wie mit symmetrischen 36 bp langen Bereichen. Liang *et al.* (2017) generieren mit teilweise doppelsträngigen, nur im Insert überlappenden Donor-ODNs die höchste HDR-Rate. Beide Studien haben gemeinsam, dass sie mit Reportergenen in menschlichen embryonalen Nieren (HEK)-Zellen arbeiteten und für ihre Studie nur je eine Zielsequenz untersuchten. Beim Vergleich mehrerer Zielsequenzen stellen Wang *et al.* (2018) fest, dass sich die optimale Länge der homologen Bereiche für unterschiedliche Zielsequenzen unterscheidet. Einig sind sich alle drei Studien, dass ODNs in der nicht-PAM-Orientierung zu höheren HDR-Raten führten. Dies bestätigen auch die Ergebnisse aus dieser Arbeit.

Bei längeren Insertionen, wie z. B. einem fluoreszierenden Protein (400-800 bp), sollten längere homologe Bereiche von mind. 150 bp (besser 500-1500 bp) verwendet werden (Shy *et al.* 2016). Einzelsträngige Donorsubstrate zeigen eine etwas höhere HDR-Frequenz und verhindern die zufällige Integration des Donor-Moleküls (Li *et al.* 2017b).

Die optimale Länge der homologen Bereiche für Insertionen kleiner als 30 bp liegt zwischen 30-80 bp und hängt von der genetischen Umgebung der Zielsequenz ab. Einzelsträngige Donor-ODNs führen in der nicht-PAM-Orientierung zu höheren HDR-Raten. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Donorplasmiden mit 480-750 bp langen homologen Bereichen konnten ebenfalls gute Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 3.9).

IV) Screening nach Mutanten

Die Identifikation von Genmutationen ist ein wesentlicher methodischer Bestandteil bei Experimenten mit CRISPR/Cas9-Nukleasen. In dieser Arbeit wurde ein PCR-basiertes Screening verwendet, das auf einer Größenänderung des Ziellocus beruht. Hierbei wurden Primer verwendet, die möglichst nah an der Zielsequenz binden und 150-200 bp lange PCR-Produkte erzeugen. Damit konnten Größenunterschiede ab ca. 15-20 Basen detektiert werden (Methoden 2.3.4). Kleinere Genmodifikationen wie Insertionen oder Deletionen einzelner Basen können auf diese Weise nicht erkannt werden und stellen eine Limitation dieser Screening-Methode dar. Bei der Analyse stellte sich heraus, dass ein Großteil der Mutationen Insertionen großer DNA-Fragmenten waren (Abbildung 3.3). In zwei Experimenten ohne vorausgegangenes PCR-Screening, in denen jeweils 96 Klone sequenziert wurden, konnten je zwei solche kleinen Mutationen identifiziert werden (Abbildung 3.7). Es ist folglich davon auszugehen, dass auch in den anderen Transformationen Insertionen und Deletionen von wenigen Basenpaaren vorhanden waren, jedoch durch das PCR-Screening unentdeckt blieben. Die tatsächlichen Mutationsraten könnten also um bis zu 2,1 % (2/96) höher sein, als in dieser Arbeit bestimmt. Die niedrige Rate kleiner Mutationen bestätigt aber auch, dass der Großteil der Mutanten durch größere Insertionen entstand und die verwendete PCR-basierte Screening-Methode geeignet ist, um ausreichend Mutanten detektieren zu können.

In den meisten Fällen zeigte sich jedoch, dass die Insertionen zu groß waren, um per PCR amplifiziert zu werden (Abbildung 3.3). Mit diesem Problem sah sich auch das Labor von Prof. Jeong Byeong-ryool bei Experimenten an *C. reinhardtii* konfrontiert. Obwohl die generierten Mutanten im Antennenkomplex-Protein SRP43 genau den erwarteten Phänotyp (hellgrüne Kolonien) zeigten, konnten sie vorerst keine Mutation an der Zielsequenz im *CpSRP43*-Locus feststellen. Erst die Sequenzierung des gesamten Genoms der potenziellen Mutante offenbarte, dass das komplette 5 kb Markerplasmid an der Schnittstelle integriert wurde (Shin *et al.* 2016). Um Schwierigkeiten durch große DNA-Integrationen zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit den Transformationen kurze 30-90 bp lange DNA-Moleküle (FLAG-Donors) beigefügt. Falls sich der gesamte Locus nicht amplifizieren ließ, konnte eine FLAG-PCR durchgeführt werden, die die Integration an der Zielsequenz bestätigte (Abbildung 3.3). Mithilfe des FLAG-Donors konnten etwa 25-50 % der Mutanten identifiziert werden. Um große Insertionen ganz zu vermeiden, dürften keine großen Markerplasmide verwendet werden. Eine Variante des Transformationsprotokolls ohne Markerplasmide wird in Abschnitt 4.2 besprochen.

Um das Screening zu vereinfachen, wäre es hilfreich, neben dem Größenunterschied auch eine Information über die Art der eingeführten Sequenz zu erhalten. Dies könnte beispielsweise durch den Einsatz einer quantitativen PCR (qPCR) ermöglicht werden. Mithilfe von DNA-Sonden, die die FLAG-Sequenz binden, erhielte man zusätzlich zur Information über die Größe des PCR-Produkts auch einen Hinweis, ob das PCR-Produkt auch die FLAG-Sequenz enthält. In Verbindung mit einer hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (HRMA) könnten außerdem Größenunterschiede von wenigen Basenpaaren detektiert werden

(Nymark *et al.* 2016). Einzelne Basenpaaraustausche könnten mit einer Ligations-Erkennungs-Reaktion (LDR)-PCR identifiziert werden (KC *et al.* 2016). Hier werden qPCR-Sonden mit der erwarteten Mutantensequenz eingesetzt, die sich nur dann an ein Verbindungsstück ligieren lassen, wenn es zu keiner Fehlpaarung kommt.

Die in dieser Arbeit verwendete PCR-basierte Screening-Methode stellt ein robustes System dar, um Insertionsmutanten zu identifizieren. Die Analysen wurden im 96-Well-Format von einem Zellextrakt durchgeführt, und für die meisten Gene konnten ohne vorherige Optimierung der PCR-Bedingungen aussagekräftige Ergebnisse produziert werden. Für ein qualitatives Mutantenscreening oder die Erkennung von Punktmutationen könnte in Zukunft ein qPCR-basiertes Screening-System entwickelt werden.

4.2 Verbesserung der Mutationsrate

l) Vergleich mit anderen Transformationsprotokollen

In der Literatur finden sich bisher nur vereinzelte Protokolle zur Verwendung von CRISPR-Nukleasen in *C. reinhardtii* – und ausschließlich Gene betreffend, die eine phänotypische Selektion erlauben (Baek *et al.* 2016; Ferenczi *et al.* 2017; Shin *et al.* 2018). Ein Hauptunterschied der publizierten CRISPR-Protokolle zu dieser Arbeit ist die Verwendung anderer Elektroporationsgeräte. Das zeigt, dass der hier verwendete Elektroporator *NEPA21* keine Voraussetzung für die Durchführung solcher Experimente ist. Allerdings wurde in den anderen Protokollen 3 bis 100-mal so viel Cas9 und gRNA eingesetzt (Tabelle 27). Die Konzentration der Zellen und der Cas9-RNPs haben einen großen Einfluss auf die Leitfähigkeit und somit auf die Elektroporationsbedingungen. Eine höhere Zelldichte führt zu einem höheren Widerstand der Lösung, während Cas9-RNPs den Widerstand senken. In dieser Arbeit wurden die Elektroporationsbedingungen optimiert für eine 40 µl Me-Suc Lösung mit 4×10^6 Zellen (10^8 Zellen/ml) und 9-12 pmol (0,23-0,30 µM) Cas9-RNP (Tabelle 27 und Kapitel 2.3.3). Diese Zell-RNP-Suspension resultierte in einem Widerstand von 400-500 kΩ. Eine Änderung von nur einem Parameter, wie beispielsweise die Erhöhung der Cas9-RNP Menge oder stärkere Elektroporationspulse, führte zu einer niedrigeren Transformationseffizienz (Abbildung 3.10).

Grundsätzlich lassen sich zwei Strategien feststellen: Findinier *et al.* (2019) und Shin *et al.* (2016) verwenden – wie auch diese Arbeit – ein Markerplasmid zur Vorselektion von Zellen, die überhaupt transformiert wurden. Das erlaubt eine Mutationsrate von 0,02 – 48 % unter den analysierten Klonen bzw. 3 – 30 % in dieser Arbeit. Baek *et al.* (2016) und Ferenczi *et al.* (2017) verwenden kein Selektionsplasmid und untersuchen alle überlebenden Zellen auf Mutationen. Dies wird möglich, indem die verwendete Zellzahl um den Faktor 100 reduziert und die RNP-Menge um den Faktor 10 erhöht wird. So wird in den Protokollen

ohne Vorselektion etwa 1000-mal so viel RNP / Zelle verwendet (Tabelle 27). Dadurch erreichen sie die höchste Rate an Mutanten pro eingesetzte Zellen ($1,4 - 5,6 \times 10^{-3}$, Tabelle 27). Allerdings liegt die Selektionsrate (Mutanten pro analysierte Zellen) im Schnitt immer noch niedriger als bei den Protokollen mit Vorselektion (Tabelle 27, „Ferenczi“).

Tabelle 27: Vergleich von RNP-Transformationsbedingungen in *C. reinhardtii*

Sp = *S. pyogenes*. *Lb* = *Lachnospiraceae* bac. ND2006. ME = MAX Efficiency Transformation Reagent for Algae. Suc = enthält 40 mM Saccharose. TAP = TAP-Medium. ^{a)} = Wert wurde durch Hochdurchsatzsequenzierung ermittelt. ^{b)} = Daten unvollständig. RNP / Zelle in Molekülen.

Referenz	Zellen	Puffer	Cas9 (pmol)	RNP / Zelle (x 10 ⁶)	Vorselektion	Mutanten / eingesetzte Zellen	Mutanten / analysierte Zellen
	pro Elektroporation						
<i>Baek et al. 2016</i>	$5,0 \times 10^5$	ME	<i>Sp</i> Cas9 (1250)	1506	keine	^{a)} 56×10^{-4}	^{b)} -
<i>Ferenczi et al. 2017</i>	$5,0 \times 10^5$	ME-Suc	<i>Lb</i> Cas12a (526)	634	keine	^{b)} 14×10^{-4}	0,02 – 29 %
<i>Shin et al. 2016</i>	$9,0 \times 10^7$	ME	<i>Sp</i> Cas9 (94)	0,6	Plasmid	4×10^{-8}	0,2 - 9 %
<i>Findinier et al. 2019</i>	$2,5 \times 10^7$	TAP-Suc	<i>Sp</i> Cas9 (39)	0,9	Plasmid	^{b)} -	^{b)} 19 - 48 %
Diese Arbeit (<i>Greiner et al. 2017</i>)	$4,0 \times 10^6$	ME-Suc	<i>Sp</i> Cas9 (12)	1,8	Plasmid	3×10^{-6}	3 - 30 %

Eine interessante Variation des Protokolls mit einem Markerplasmid wurde von Findinier *et al.* (2019) entworfen. Hier wird die Resistenzkassette ohne das Vektor-Grundgerüst transformiert. Somit verkürzt sich die transformierte DNA auf 2 kb und erlaubt eine robuste Amplifikation des Genlocus mittels PCR. Tatsächlich wurde im Großteil der isolierten Mutanten die Integration der kompletten Resistenzkassette beobachtet. Diese Tatsache kann jedoch auch von Nachteil sein, da sich die Antibiotikaresistenz nicht mehr von der Mutation trennen lässt, der Resistenzmarker also nicht mehr herausgekreuzt werden kann. Somit können die Stämme nur so oft für weitere Mutationen transformiert werden, wie Selektionsmarker zur Verfügung stehen.

Ein weiterer Unterschied ist die von Ferenczi *et al.* (2017) verwendete Cas12a- statt der Cas9-Nuklease, auf deren Eigenschaften im nächsten Kapitel eingegangen wird. Die beobachtete präzise Einbaurate eines 6x His-Epitops durch Cas12a fiel mit 30-50 % aller Mutanten höher aus, als die in dieser Arbeit im Durchschnitt beobachteten 9,4 % mit Cas9 (Abbildung 3.8). Im direkten Vergleich von Cas12a und Cas9 in menschlichen Zellen konnte allerdings keine unterschiedliche HDR-Rate festgestellt werden (Wang *et al.* 2018). Das mag für *C. reinhardtii* im direkten Vergleich von Cas12a und Cas9 jedoch anders sein.

Die Übersicht der verschiedenen Protokolle in Tabelle 27 zeigt die große Bandbreite an erfolgreich angewendeten Transformationsbedingungen. Ohne die Verwendung von Plasmid-DNA zur parallelen Selektion sinkt das Risiko mutagener Effekte durch zufällige Integration des Plasmids ins Genom. Sollte die Effizienz der Transformationen ohne Selektionsmarker noch erhöht werden und somit auch Mutanten in nicht-selektierbaren

Genen identifiziert werden können, wäre das die eleganteste und sicherste Methode, um Mutationen ins Algen-genom einzuführen.

II) Zwei-Schritt-Protokoll zur Einführung von Punktmutationen

Für einige detaillierte Analysen der Proteinfunktion ist es nötig, einzelne Aminosäuren auszutauschen. So können Proteinvarianten erstellt werden, die beispielsweise konstitutiv aktiv bzw. inaktiv sind, oder bei Proteinen mit unterschiedlichen Domänen lassen sich gezielt nur bestimmte Funktionen ein- und ausschalten. Der Austausch von Aminosäuren lässt sich durch die Einführung gezielter Punktmutationen im Zielgen durchführen. Theoretisch ließen sich Austausche weniger Nukleotide mit der gleichen Transformationsvorschrift durchführen, wie beispielsweise das in dieser Arbeit beschriebene Einfügen eines 30 bp langen Protein-Tags (Abbildung 3.3 und Abbildung 3.7). Hierbei ergeben sich allerdings zwei Schwierigkeiten: i) Der Cas9-RNP-Komplex muss möglichst nah (± 20 bp) an dem zu mutierenden Nukleotid schneiden. Das heißt, die Auswahl an möglichen Zielsequenzen ist stark eingeschränkt und die Wahrscheinlichkeit, eine gRNA mit hoher Aktivität zu finden, entsprechend geringer. Es muss also potenziell mit gRNAs gearbeitet werden, die nur eine niedrige Aktivität aufweisen, was dazu führen kann, dass 200-400 Klone analysiert werden müssen, um 1-2 korrekte Basenpaaraustausche zu identifizieren. ii) Mutationen, die sich in nur 1-3 Basen von der WT-Sequenz unterscheiden, können nicht über eine Größenänderung des mittels PCR amplifizierten Ziellocus identifiziert werden. Um Mutanten mit einer Punktmutation von der WT-Sequenz zu unterscheiden, müssten alle Klone direkt sequenziert werden. Alternative Methoden wie z. B. ein Fehlpaarungs-Testverdau (*mismatch cleavage assay*) (Solaro *et al.* 1993; Vouillot *et al.* 2015) konnten noch nicht für *C. reinhardtii* etabliert werden (Sizova *et al.* 2013).

Als Alternative wird im Folgenden eine Methode vorgestellt, in der die Punktmutation in zwei Transformationsschritten eingeführt wird (Abbildung 4.2 B). In der ersten Transformation wird an der Stelle, an der die Punktmutation eingeführt werden soll, eine FLAG-Sequenz inseriert. Der so entstehende Größenunterschied im Ziellocus kann per PCR dargestellt werden. Als FLAG-Sequenz wird die schon bewährte *EMX1-1* Cas9-Zielsequenz verwendet (Ran *et al.* 2015, Abbildung 4.2 A). Zusätzlich sind Stoppcodons in allen sechs Leserahmen eingebracht, um einen Abbruch der Translation zu gewährleisten. Somit enthält diese Donor-DNA keine genspezifischen homologen Bereiche, sondern kann universell eingesetzt werden („FLAG_{v2}“, Abbildung 4.2 A). Nach Isolierung eines Stammes, in dem nur die FLAG_{v2}-Sequenz an der Cas9-Schnittstelle inseriert ist, kann dieser in einer zweiten Transformation mit einem Cas9-RNP, der die *EMX1-1*-Sequenz schneidet, transformiert werden. Eine Donor-DNA, die die Punktmutation vorgibt, induziert das Herausschneiden der FLAG_{v2}-Sequenz und den Einbau der Punktmutation. Die korrekte Reparatur kann wieder per PCR über einen Größenunterschied identifiziert werden, da sich das PCR-Produkt um die Länge der FLAG_{v2}-Sequenz verkleinert (Abbildung 4.2 B+C). Anstelle einer Punktmutation lässt sich auch die FLAG-Mutante zurück zur WT-Sequenz reparieren (Abbildung 4.2, „WT*“).

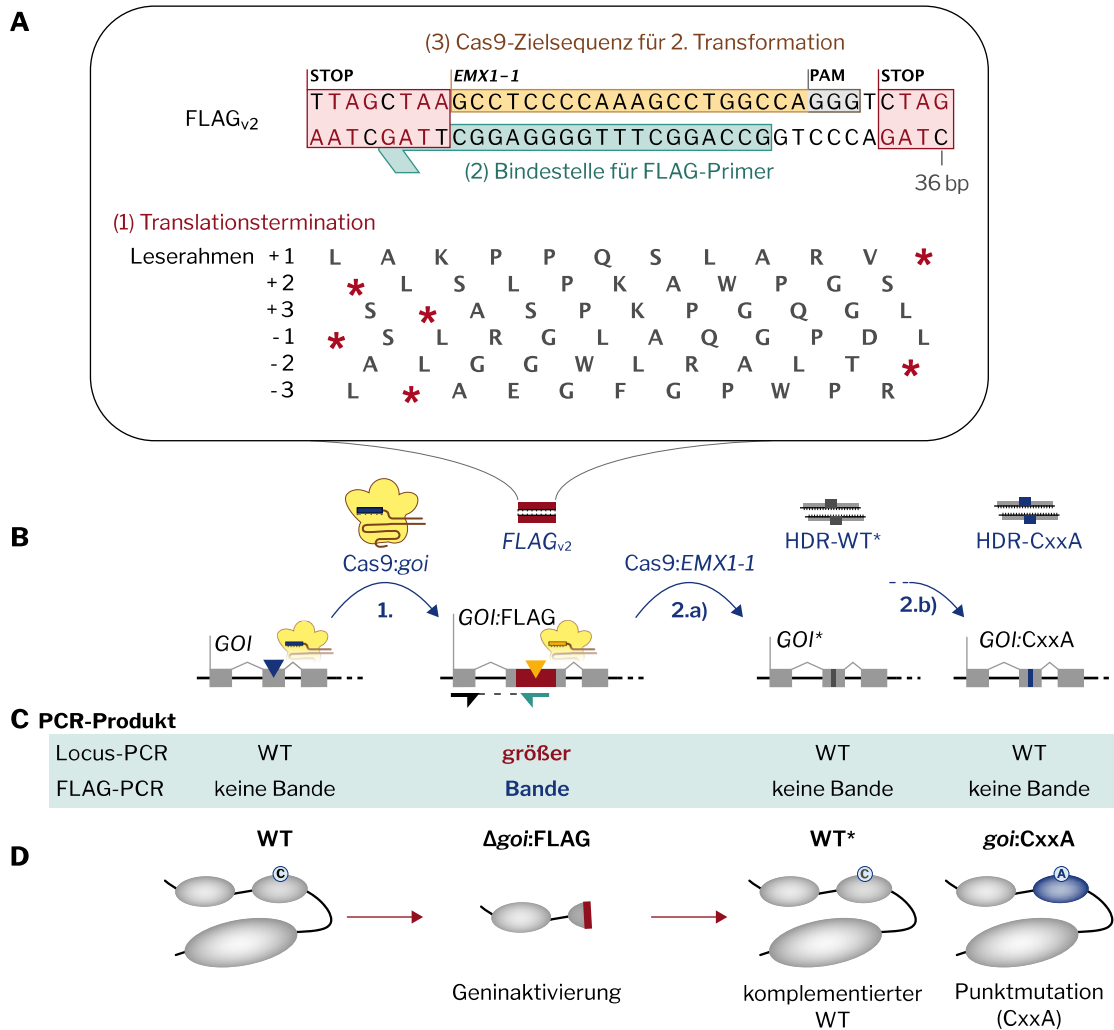


Abbildung 4.2: Einführung von Punktmutationen in einem Zwei-Schritt-Protokoll.

A) Sequenz und Eigenschaften der FLAG_{v2}-Sequenz. (1) Stoppcodons in allen sechs Leserastern führen zur Translationstermination. (2) Die Sequenz eignet sich als Template für eine FLAG-PCR. (3) Die EMX1-1-Zielsequenz ist eine effiziente Cas9-Zielsequenz (Ran *et al.* 2015). **B)** Die Punktmutation bzw. Komplementation wird in einer Zwei-Stufen-Transformation durchgeführt. Im ersten Schritt wird die FLAG_{v2}-Sequenz in das Zielgen inseriert und es entsteht ein Knockout-Stamm. Im zweiten Schritt wird die FLAG_{v2}-Sequenz herausgeschnitten und die Punktmutation eingeführt. Um die Komplementation von der WT-Sequenz zu unterscheiden, wird eine „stille“ Punktmutation eingeführt (WT*). **C)** Die Transformationsschritte können per PCR überprüft und unterschieden werden. **D)** Erwartete Auswirkung der Mutationen auf Proteinebene.

Zur physiologischen Charakterisierung einer Mutante ist es üblich, den WT-Phänotyp wiederherzustellen. Nur so kann der beobachtete Phänotyp des mutierten Stammes auf die Mutation im Zielgen zurückgeführt werden. Meist wird dazu eine weitere funktionelle Kopie des Gens in die Zelle transformiert. Dies kann aber zu unerwünschten Nebeneffekten führen, da die Expression der exogenen Kopie durch den Integrationsort im Genom beeinflusst ist und sich deshalb von der WT-Expression unterscheiden kann. Durch die vorgestellte zweistufige Transformation kann diese Komplementation der Mutation direkt am Zielgen erfolgen. Dieses Konzept konnte bereits von Olga Baidukova für die Erstellung

einer Punktmutation im *ChR1*-Gen erfolgreich angewendet werden (Olga Baidukova, persönliche Kommunikation).

Mit dem Zwei-Schritt-Protokoll lassen sich alle für eine fundierte physiologische Charakterisierung benötigten Stämme, das heißt der Knockout-Stamm, die Punktmutationen und die Wiederherstellung zum WT, parallel herstellen (Abbildung 4.2 D).

III) Verbesserung der HDR-Rate

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch präzise Genveränderungen wie die Integration von Protein-Tags und Fluoreszenzproteinen möglich sind (Abschnitt 3.2.3). Die Frequenz dieser präzisen Markierungen lag im Durchschnitt bei 9,4 % unter den mutierten Klonen (HDR-Rate) bzw. 1,1 % aller analysierten Klone (Abbildung 3.8). Dies ist eine HDR-Rate wie sie auch in Experimenten mit Pflanzenzellen erzielt wird (Mao *et al.* 2019). Nur in tierischen Zellen können oft HDR-Raten bis zu 50-80 % erzielt werden (Richardson *et al.* 2016; Dokshin *et al.* 2018), allerdings gibt es auch hier je nach Organismus und Zelltyp große Unterschiede.

Daraus ergab sich die Frage, ob und wie die zu Grunde liegende HDR-Rate verbessert werden kann. Die Art der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur entscheidet über die Art der entstehenden Mutation. Eine Strategie zur Verbesserung der HDR-Rate ist deshalb die Unterdrückung der unerwünschten Reparaturmechanismen der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ). Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung alternativer Nukleasen und Donor-DNAs, um die Zugänglichkeit für Homologie-vermittelte DNA-Reparaturen zu verbessern.

Zur Optimierung der HDR-Rate wurde in dieser Arbeit der Blau-Grün-Test entwickelt, der die Bestimmung der HDR-Rate in einer großen Anzahl an Klonen ermöglicht. Mutationen im *SNRK2.2*-Gen lassen sich durch eine Farbreaktion sichtbar machen (Abbildung 3.10). Blau gefärbte Kolonien können durch Sequenzierung gezielt auf die Art der Mutation überprüft werden. Damit lassen sich die HDR-Rate bestimmen und verschiedene Transformationsbedingungen miteinander vergleichen (Abbildung 3.11).

Mit dem Blau-Grün-Test ist die Grundlage für zukünftige Experimente zur Optimierung der HDR-Rate geschaffen.

IV) Aktivierung der Homologie-vermittelten DNA-Reparatur

Die erwünschte HDR konkurriert mit dem unerwünschten NHEJ. Durch den Eingriff in die DNA-Reparatursysteme kann dieses Verhältnis verändert werden. Durch eine Hemmung von Proteinen, die am Prozess des NHEJ beteiligt sind, kann eine höhere HDR-Rate erzielt werden (Chu *et al.* 2015; Black *et al.* 2016). Dr. Irina Sizova hat Mutantenstämme hergestellt, in denen die Gene *KU70*, *KU80* und *POLQ* inaktiviert sind (Greiner *et al.* 2017). In ersten vorläufigen Experimenten konnte in den $\Delta ku70$ - und $\Delta ku80$ -Stämmen eine leichte Erhöhung der HDR-Rate festgestellt werden (Dr. Irina Sizova, persönliche Kommunikation). Ohne *KU70* oder *KU80* ist der NHEJ-Wirkmechanismus etwas gehemmt, aber nicht komplett inhibiert. In der $\Delta polQ$ -Mutante ist ein größerer Effekt festzustellen: So war die Anzahl an transformierten Kolonien, die durch die Antibiotika-Vorselektion gewonnen wurden, um etwa das Hundertfache reduziert (Dr. Irina Sizova, persönliche Kommunikation). Ohne *POLQ* kann jedoch entweder der Resistenzmarker nicht mehr effizient ins Genom eingebaut werden – da dieser Vorgang ebenfalls von der NHEJ-Reparatur und *POLQ* abhängig ist – oder die Stresstoleranz ist reduziert, so dass Verfahren wie Transformationen (Fremd-DNA, spontane Doppelstrangbrüche) zu einer niedrigeren Überlebensfähigkeit führen. Da sich diese Mutante nur schwer transformieren lässt, konnte bisher keine Analyse durchgeführt werden. Eine abschließende Aussage ist zum jetzigen Zeitpunkt schwierig. Es zeigt sich aber, dass Eingriffe in die zelleigenen DNA-Reparatursysteme komplexe Auswirkungen haben können.

Eine andere Methode, um die am NHEJ beteiligten Faktoren zu hemmen, ist der Einsatz von chemischen Inhibitoren (Maruyama *et al.* 2015; Song *et al.* 2016; Li *et al.* 2017). Weit verbreitet ist die Chemikalie Scr7, ein Inhibitor gegen das Enzym Ligase IV, einen Faktor im NHEJ-Prozess. Erik Zscheschang unternahm in seiner Masterarbeit erste Versuche zur Verwendung von Scr7 in *C. reinhardtii*. Unter Zugabe von 1 μM Scr7 während der Transformation zeigten 11 von 37 Mutanten eine präzise Gen-Modifikation. Das entspricht einer HDR-Rate von 30 %, die also 3-mal so hoch ist wie ohne die NHEJ-Hemmung (Zscheschang 2018). Diese Ergebnisse sollen noch einmal mit einer größeren Anzahl an Mutanten, beispielsweise unter Verwendung des Blau-Grün-Tests, bestätigt werden. Die Daten liefern aber einen ersten Hinweis darauf, dass Scr7 auch in *C. reinhardtii* wirksam sein könnte.

Eine interessante Alternative, um in zukünftigen Experimenten spezifische Faktoren nur transient zu deaktivieren, ist für die Verwendung einer CRISPR-Ribonuklease. Cas13a ist wie Cas9 eine RNA-geleitete Nuklease, schneidet aber RNA anstatt DNA. Für die Vertreter aus *Leptotrichia wadei* (*LwaCas13a*) und *Prevotella sp. P5-125* (*PspCas13b*) wurde gezeigt, dass sie effizient und spezifisch die Expression von Zielgenen unterdrücken können (Abudayyeh *et al.* 2016, 2017). Werden diese Nukleasen als RNP der Transformation beigefügt, wäre eine transiente Inhibition z. B. von *POLQ* möglich und eine dauerhafte genomische Destabilisierung könnte vermieden werden.

V) Vergleich zwischen ZFN, Cas9 und Cas12a

Eine andere Möglichkeit, die Art der Mutation zu beeinflussen, ist die Wahl der Nuklease. Zinkfinger-, Cas9- und Cas12a-Nucleasen unterscheiden sich in ihrer Bindeaffinität, Verweildauer und der Art der generierten Überhänge nach dem DNA-Doppelstrangbruch. Dies beeinflusst die Zugänglichkeit für die konkurrierenden HDR- und NHEJ-Enzyme an den DNA-Enden und somit auch die Art der resultierenden Mutationen. ZFN sind synthetische Proteine, die aus der ZF-Bindedomäne und der unspezifischen Nuklease *FokI* bestehen. Das Design der ZF-Bindedomäne ist aufwendig, da noch einige Parameter unbekannt sind, die zu einer effektiven Bindung führen. Allerdings zeigen die *FokI*-Dimere die schnellste Schneidekinetik unter den drei Nucleasen: sie dissoziieren nach wenigen Sekunden ($k_D = 0,5 \text{ s}^{-1}$; Pernstich & Halford 2012). Cas9 hat eine (extrem) langsame DNA-Dissoziationskonstante ($k_D = 5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, Raper *et al.* 2018), was zu einer Aufenthaltszeit an der (bereits geschnittenen) DNA von mehreren Stunden führen kann. Eine lange Bindung der Nuklease an einem der DNA-Enden könnte gerade für die Proteine der homologen Rekombination ein Problem sein, da eine erfolgreiche Reparatur nur stattfinden kann, wenn beide DNA-Enden zur Verfügung stehen.

Im Unterschied zu Cas9 verwenden Cas12a-Nucleasen eine kürzere und einteilige gRNA und benötigen eine A/T-reiche PAM ("NTTT"), die im GC-reichen Genom von *C. reinhardtii* selten vorkommt (Zetsche *et al.* 2015; Ferenczi *et al.* 2017). Ein weiterer Unterschied sind die DNA-Enden. Während Cas9 zwei gleich lange Enden (*blunt ends*) hinterlässt, entstehen durch Cas12a (wie bei ZFNs) einzelsträngige Überhänge von vier Basen (*sticky ends*, Tabelle 28).

Tabelle 28: Vergleich der Eigenschaften von ZFN, Cas9 und Cas12a.

V = A, C, G;

Nuklease	Schnitt	PAM	Zielsequenz-Vorhersage
ZFN	mit 4 bp Überhang	-	--
Cas9	ohne Überhang	NGG	+
Cas12a	mit 4 bp Überhang	TTTV	-

Im Verlauf dieser Studie konnte die Funktionalität der alternativen CRISPR-Nucleasen *LbCas12a*, *AsCas12a* und *SaCas9* zwar *in vitro* und im *aphVIII*-Reparatursystem bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), jedoch war die Mutationsrate im Blau-Grün Assay zu gering (<1 %), um die HDR-Rate zu erfassen. Um also qualitative Unterschiede zwischen den Nucleasen in *C. reinhardtii* festzustellen, müssten weitere Zielsequenzen getestet werden. Die niedrige Mutationsrate könnte aber ein erster Hinweis sein, dass es verglichen mit Cas9 für Cas12a schwieriger ist, effiziente Zielsequenzen im Genom von *C. reinhardtii* zu finden.

Die in dieser Arbeit verwendeten ZFNs zeigten höhere HDR-Raten (8-20 % präzise FLAG-Insertionen, Abbildung 3.4) als die Cas9-Nuklease (0-6 % präzise FLAG-Insertionen, Abbildung 3.8). Dies ist ein Hinweis, dass die Art der Nuklease einen Einfluss auf die HDR-Rate hat und möglicherweise Nucleasen mit kürzerer Bindezeit den Enzymen der HDR besseren

Zugang ermöglichen. Allerdings können diese Ergebnisse kaum verallgemeinert werden, da nur drei ZFN-Zielsequenzen untersucht wurden. Außerdem sollte ein Reporter gen wie beispielsweise *SNRK2.2* benutzt werden, um eine größere Anzahl von Mutanten zu untersuchen.

Als die Cas12a-Nuklease entdeckt wurde, postulierten die Autoren, dass sich dadurch Insertionen über passende Überhänge integrieren ließen (Zetsche *et al.* 2015). Präzise Integrationen wären so unabhängig von der Homologie-vermittelten DNA-Reparatur möglich. Besonders für Zellen und Organismen wie *C. reinhardtii*, in denen die konkurrierende nicht-homologe DNA-Reparatur vorherrscht, könnte das ein großer Vorteil sein. Allerdings konnte dies bis heute nicht experimentell bestätigt werden. Direkte Vergleiche zwischen Cas9 und Cas12a deuten eher darauf hin, dass die Unterschiede zwischen verschiedenen Zielsequenzen und deren Positionseffekte eine größere Rolle spielen als die verwendete Nuklease (Wang *et al.* 2018). Durch die enorme Vielfalt der CRISPR-Nukleasen ist es gut möglich, dass noch Nukleasen mit neuartigen Eigenschaften entdeckt werden, die sich besser für präzise Genmodifikationen eignen.

4.3 Photorezeptoren in *C. reinhardtii*

In dieser Arbeit konnten mithilfe der neu etablierten Protokolle Mutantenstämme der Photorezeptorgene *COP1/2*, *ChR1*, *ChR2*, *COP5*, *COP6*, *COP8*, *COP11/12*, *aCRY*, *PHOT* und *UVR8* hergestellt werden, die nun Grundlage für eine fortführende Charakterisierung sind. Im Folgenden soll eine Übersicht über den aktuellen Stand der Forschung und die offenen Fragestellungen hinsichtlich der Funktion dieser Gene gegeben werden.

l) Chlomyopsin-1/2 (COP1/2)

Die physiologische Funktion von Chlomyopsin-1/2 (COP1/2) ist noch weitgehend unbekannt. Die Lokalisation im Augenfleck würde einen Zusammenhang mit der Phototaxis nahelegen (Fuhrmann *et al.* 1999; Schmidt *et al.* 2006). Eine Hemmung der *cop1/2*-Expression durch RNA-Interferenz hat die Phototaxis jedoch nicht beeinflusst (Fuhrmann *et al.* 2001). Auch in den in dieser Arbeit hergestellten $\Delta cop1/2$ -Mutanten (Abbildung 3.7) konnte keine veränderte Phototaxis festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch sind die neuen Mutanten den RNAi-Stämmen überlegen, da die Expression in den Gen-Knockouts vollständig und dauerhaft ausgeschaltet ist. Sie sind nun Gegenstand aktueller Untersuchungen, welche die physiologische Bedeutung von COP1/2 klären soll. Außer im Augenfleck ist COP1/2 auch im Chloroplasten lokalisiert (Ozawa *et al.* 2009; Nellaepalli *et al.* 2018) und das Transkriptionsprofil ähnelt Photosynthesegenen (Abbildung 1.4), weshalb eine Beteiligung an der Photosynthese nicht ausgeschlossen werden kann. In Kooperation mit Dimitrios Petroustos (*CEA Grenoble*) fand Angeliki Tsihla in ersten Untersuchungen heraus, dass die $\Delta cop1/2$ -Mutanten unter Starklicht eine geringere PSII Photosynthesekapazität (Fv/Fm) und Elektronentransportrate (ETR) aufwiesen (Dimitrios Petroustos, persönliche Kommunikation).

Um einen Zusammenhang zwischen Phototaxis und Photosynthese zu untersuchen, sollten Phototaxismessungen an den $\Delta cop1/2$ -Mutanten unter (i) synchronisierten Wachstumsbedingungen, (ii) nach Inkubation mit unterschiedlich starker Belichtung und (iii) nach dem Einsatz eines Photosyntheseinhibitors wie z. B. 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylharnstoff (DCMU) durchgeführt werden (Gorman & Levine 1965). Da COP1/2 als Retinal-bindendes Protein identifiziert wurde (Beckmann & Hegemann 1991), ist auch eine Rolle in der Retinal-Biosynthese, dem Retinal-Transport oder der Regeneration der Kanalrhodopsine möglich. Um dies zu untersuchen, wird die Phototaxis nach sehr langer und starker Belichtung gemessen. Auch ein Doppel-Knockout mit Genen der Retinal-Biosynthese wie beispielsweise die All-trans-8'-Apo- β -Carotenal 15,15'-Oxygenase (*DIOX1*, Cre06.g278199) könnte Hinweise auf die Funktion von COP1/2 liefern.

Um die unterschiedlichen Rollen der beiden Spleißvarianten COP1 und COP2 zu untersuchen, wurde mit CRISPR/Cas9 eine spleißspezifische YFP-Markierung an COP1 angefügt (Abbildung 3.9). Zusätzlich wäre es sinnvoll, COP2 mit einem mCherry-Fluoreszenzprotein zu markieren, um die Lokalisation beider Proteine vergleichen zu können. Die *cop1*- und *cop2*-mRNA unterscheiden sich in ihrem letzten Exon: Die *cop2*-mRNA beinhaltet Exon 1-9, jedoch befindet sich am Ende von Exon 8 ein Stoppcodon und nur die Exons 1-8 werden translatiert. In der *cop1*-mRNA wird Exon 8 herausgespleißt und stattdessen Exon 9 translatiert (Fuhrmann *et al.* 2007). Man könnte nun die alternative Spleißstelle am Ende von Exon 7 oder eines der Exons 8 oder 9 deletieren, um spezifisch nur eine der Spleißvarianten zu inaktivieren. Bei den in dieser Arbeit generierten Mutanten handelt es sich um einen COP1/2-Doppel-Knockout, da Exon 1 unterbrochen wurde (Abbildung 3.7). Deletionen von mehr als 30 bp wurden mit CRISPR-Nukleasen in *C. reinhardtii* noch nicht durchgeführt. Das *COP1/2*-Gen wäre ein geeigneter Kandidat, um zu überprüfen, ob und wie größere Deletionen mit Cas9-RNPs durchführbar sind.

II) Die Kanalrhodopsine (ChRs)

Kanalrhodopsin-1 (ChR1) und Kanalrhodopsin-2 (ChR2) sind lichtgesteuerte Ionenkanäle und die Photorezeptoren, die die Phototaxis in *C. reinhardtii* steuern (Kapitel 1.1.3). Bislang war unklar, ob ChR1 und ChR2 sich dabei komplementieren oder eine unterschiedliche physiologische Rolle einnehmen. Anhand der in dieser Arbeit untersuchten Mutanten konnte festgestellt werden, dass im Stamm CC-3403 hauptsächlich ChR1 an der Phototaxis beteiligt ist, während in der ChR2-Deletionsmutante keine Veränderung der Phototaxis festzustellen ist (Abbildung 3.5). Wurde jedoch ChR1 inaktiviert, kann nur noch mit Licht von hoher Intensität eine phototaktische Reaktion ausgelöst werden (Abbildung 3.5). Fehlen beide ChRs, ist die Phototaxis komplett inaktiviert (Abbildung 3.5). Die einzelnen und kombinierten ChR-Knockouts konnten zum ersten Mal sicher zeigen, dass ohne die Kanalrhodopsine keine Phototaxis möglich ist und dass ChR1 und ChR2 einen unterschiedlichen Anteil dazu beitragen.

Die Rolle von ChR2 bleibt bislang noch ungeklärt. Eine interessante Beobachtung sollte in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden: Zur Bestätigung, ob es sich

bei den $\Delta chr1$ - und $\Delta chr2$ -Stämmen tatsächlich um Knockouts handelte, wurde die Abwesenheit der ChR-Proteine mit Immunoblot-Analysen bestätigt. Dabei zeigte sich, dass in den $\Delta chr1$ -Mutanten die ChR2-Proteinmenge anstieg. Während ChR2 in den WT-Stämmen CC-3403 und CC-125 (kaum) detektierbar ist, wurde besonders in der $\Delta chr1$ -Mutante im CC-125-Stamm eine Erhöhung der ChR2-Proteinmenge beobachtet (Abbildung 4.3). Für ChR1 war dieses Phänomen in den $\Delta chr2$ -Mutanten nicht oder nur schwach zu beobachten (Greiner *et al.* 2017). Falls sich dies bestätigt, es also eine – voneinander abhängige – Regulation zwischen ChR1 und ChR2 gibt, müssten die Experimente an den Einzel-Knockouts verändert durchgeführt werden. Um die Aktivität von einem der Kanalrhodopsine zu inhibieren, ohne die Expression des anderen Kanalrhodopsins zu induzieren, könnten Mutanten hergestellt werden, die die Funktion ausschalten, ohne die Expression zu beeinflussen. Vielversprechend wäre hier beispielsweise die Substitution des Aspartats im Gegenionenkomplex im ChR1 an der Stelle 299 in ein Asparagin (D253A in ChR2) oder des Arginins im extrazellulären Ausgangskanal an der Stelle 159 (R120A in ChR2). Für beide Mutationen zeigen elektrophysiologische Messungen eine drastischen Reduktion der Kanalströme ohne die Expression zu beeinflussen (Kato *et al.* 2012; Plazzo *et al.* 2012).

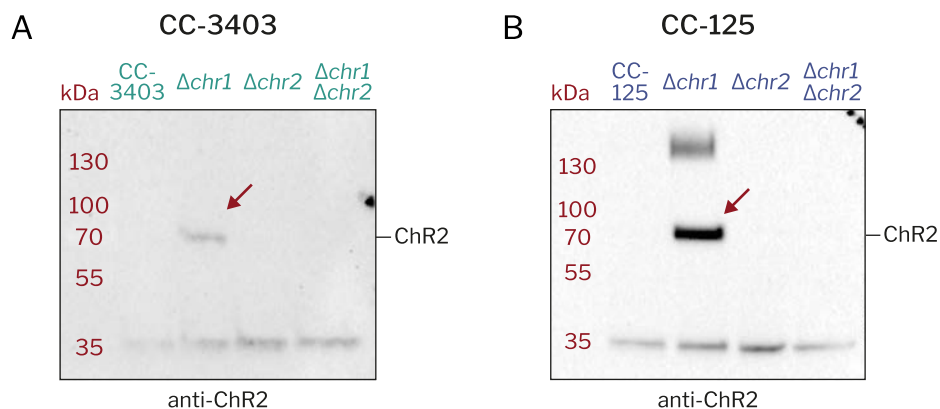


Abbildung 4.3: Analyse der ChR2-Proteinmengen in den $\Delta chr1$ -Knockouts.

Immundetektion von ChR2 der CC-3403 Mutantenstämmen "*chr1*" (PH006), "*chr2*" (PH009) und "*chr1 chr2*" (PH012) und der CC-125 Mutantenstämmen "*chr1*" (PH085), "*chr2*" (PH128) und "*chr1 chr2*" (PH105). Die Zelllysaten wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Anti-ChR2-Antikörper (PROGEN #651180) laut dem Protokoll von Greiner *et al.* (2017) detektiert.

III) Die Histidin-Kinase-Rhodopsine (HKRs)

Im Zuge dieser Arbeit wurden die ersten HKR-Mutanten in *C. reinhardtii* erzeugt ($\Delta cop5$, $\Delta cop6$, $\Delta cop8$, $\Delta cop11/12$). HKRs sind Enzymrhodopsine, in denen die Rhodopsin-Domäne mit (sehr) langen C-terminalen Resten gekoppelt ist. So enthalten sie die Histidin-Phosphotransfer-Domäne und zusätzlich u.a Cyclase-Domänen (Abbildung 1.3). Da HKR7/8 (*COP11/12*) das am stärksten exprimierte HKR ist und als einziges HKR eine lichtaktivierte Expression zeigt (Abbildung 1.5), könnte sich seine Funktion von der der anderen HKRs

unterscheiden. Somit wäre die $\Delta cop11/12$ -Mutante ein geeigneter Kandidat für erste physiologische Charakterisierungen. Die Sequenzhomologien innerhalb der HKRs (*COP5-10*) könnten darauf hinweisen, dass sich auch die Funktion überschneidet. Um also herauszufinden, bei welchen physiologischen Prozessen die HKRs eine Rolle spielen, wird es nötig sein, einen Stamm zu generieren, in dem HKR1-6 gemeinsam inaktiviert sind. Hier könnte auch ein Mutantenstamm nützlich sein, der ein Defekt in der Retinal-Biosynthese aufweist (z.B. *DIOX1*, Cre06.g278199). Ohne Retinal wäre die Funktion aller Rhodopsine in der Zelle gestört.

Zwei lichtabhängige physiologische Prozesse in *C. reinhardtii* seien hier erwähnt, da bislang unbekannt ist, ob und durch welche Photorezeptoren sie gesteuert werden und ob eine Beteiligung von Histidin-Kinase-Rhodopsinen möglich ist:

1) Die Adhäsion der Flagellen an Oberflächen ist lichtaktiviert (Lewin 1956). Durch Messung der Adhäsionskräfte an einer Glasoberfläche wurde ein Aktivitätsspektrum von 430-490 nm ermittelt (Kreis *et al.* 2018), was auf einen Blaulichtrezeptor hindeutet und damit auch auf das Absorptionsspektrum mikrobieller Rhodopsine passen würde. Die Regulation findet auf Proteinebene statt, da die Adhäsion nach Einschalten des Lichts schon nach 5-40 Sekunden auftritt (Kreis *et al.* 2018). Neben den Cryptochromen, Phototropin und den Kanalrhodopsinen könnte auch die katalytische Aktivität der langen cytosolischen C-terminalen Reste der HKRs diese Funktion übernehmen. HKR4 (*COP8*) könnte ein interessanter Kandidat für diese Rolle sein, da HKR4 nach Lichtinkubation in die Flagellen wandert (Awasthi *et al.* 2016). Erste Adhäsionsmessungen mit verschiedenen $\Delta phot$ -, $\Delta chr1$ - und $\Delta chr2$ -Mutanten wurden bereits in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Oliver Bäumchen (*MPI Göttingen*) durchgeführt. Jedoch zeigte sich, dass sich die beiden Stämme, die bislang für die Herstellung der Mutanten verwendet wurden, nicht für die Adhäsionsmessungen eignen. Der CC-3403 ist ein Stamm ohne Zellwand und platzt beim Ansaugen mit der Mikropipette. Der CC-125 hat eine Zellwand, zeigt aber mit und ohne Licht keine Adhäsion (Dr. Oliver Bäumchen, persönliche Kommunikation). Bei Experimenten mit *C. reinhardtii* müssen also immer die spezifischen physiologischen Eigenschaften des verwendeten Stammes berücksichtigt werden. Deshalb wurden neue $\Delta phot$ -, $\Delta chr1$ - und $\Delta chr2$ -Mutanten im SAG32-11b Hintergrund generiert und die Adhäsion gemessen. Alle Mutanten zeigten eine mit dem WT vergleichbare lichtinduzierte Adhäsion (Dr. Oliver Bäumchen, persönliche Kommunikation).

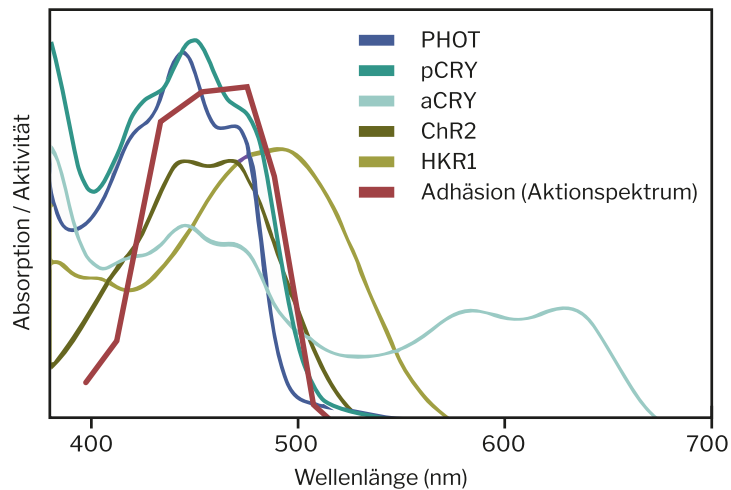


Abbildung 4.4: Absorptionsspektren ausgewählter Photorezeptoren.

Die Absorptionsspektren der Photorezeptoren (blau bis grün) wurden von Müller *et al.* (2017) entnommen. Das Aktionspektrum der Flagellen-Adhäsion (rot) stammt von Dr. Oliver Bäumchen (persönliche Kommunikation).

Es sollten also weitere Photorezeptor-Knockouts inklusive der HKRs und *COP8* im SAG32-11b-Stamm hergestellt und die lichtaktivierte Adhäsion untersucht werden. Außerdem würde sich bei *COP8* eine Markierung mit einem Fluoreszenzprotein anbieten, um die Dynamik der Lokalisationsänderung *in vivo* und damit in einer höheren Zeitaufklärung untersuchen zu können.

2) Der zweite potenziell durch einen Photorezeptor regulierte Prozess ist die zirkadiane Rhythmik. *C. reinhardtii*-Zellen passen ihre Zellteilung an den Tag-Nacht-Lichtrhythmus an (Mittag & Wagner 2003; Matsuo & Ishiura 2011). In höheren Pflanzen wird die innere Uhr durch Phytochrome und Cryptochrome an den Tag-Nacht-Rhythmus der Umwelt angeglichen (McClung 2006). Von den Cryptochromen *CRY1+2* in *Arabidopsis thaliana* konnten homologe Proteine in *C. reinhardtii* identifiziert werden (*aCRY*, *pCRY* und *CRY-DASH1+2*, Hegemann 2008; Beel *et al.* 2013). Für die Phytochrome allerdings, konnten in *C. reinhardtii* keine homologen Proteine identifiziert werden – zumindest nicht für die photoaktive GAF-Domäne. Die Histidin-Kinase-Domäne von *A. thaliana* Phytochrom (*AtPHYA*) zeigt jedoch Homologien zu HKR1 (*COP5*) in *C. reinhardtii*. Dies führt zu der Frage, ob diese oder eine ähnliche Funktion der Phytochrome in Pflanzen in Grünalgen durch HKRs übernommen werden. Die Photochemie von HKR1 (*COP5*) deutet auf eine Funktion als molekularer (Licht)Schalter hin (Luck *et al.* 2012; Penzkofer *et al.* 2014; Luck & Hegemann 2017; Luck 2018). Es sollte folglich speziell eine potenzielle Rolle in der zirkadianen Rhythmik untersucht werden. Matsuo und Kollegen fusionierten ein Luciferase-Reportergen mit zirkadian gesteuerten *Rhythm of Chloroplast(ROC)*-Genen und können so die Rhythmik über Biolumineszenz-Messungen *in vivo* mitverfolgen (Matsuo *et al.* 2008; Niwa *et al.* 2013). Um die Beteiligung dieser Photorezeptoren an der zirkadianen Rhythmik zu untersuchen, sollte eine neue Reihe an HKR- und Cryptochrom-Mutanten im Rhythmik-Reporterstamm von Dr. Matsuo hergestellt

werden.

Neben der Flagellen Adhäsion und der zirkadianen Rhythmik könnten die Histidin-Kinase-Rhodopsine aber auch bei anderen lichtgesteuerten Prozessen wie beispielsweise beim sexuellen Lebenszyklus wie der Gametogenese und der Zygotenkeimung (Pan *et al.* 1997; Huang & Beck 2003; Kottke *et al.* 2017), der Regulation der Phototaxis oder der Photosynthese und den daran beteiligten Prozessen (Petroustos *et al.* 2016) eine Rolle spielen. Um der Schwierigkeit vorzubeugen, dass sich einige Prozesse nur in speziellen Stämmen untersuchen lassen, sollten schon vor der Herstellung neuer Photorezeptor-Knockouts die Stammanforderungen der nachfolgenden physiologischen Experimente berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit ist es gelungen ein robustes Protokoll zu etablieren, um Gene in *C. reinhardtii* gezielt zu verändern. Mithilfe von Cas9-RNPs wurden mehr als 20 Gene inaktiviert und zwei Gene konnten mit einer präzisen Insertion modifiziert werden.

Durch die Identifikation potenter Zielsequenzen in 10 Photorezeptorgenen und der Herstellung von Deletionsmutanten wurde eine ergiebige Grundlage für die detaillierte physiologische Untersuchung der Photorezeptoren in *C. reinhardtii* geschaffen.

Das hier etablierte Protokoll bietet auch für biotechnologische Anwendungen neue Möglichkeiten, da die für den gewünschten Prozess benötigten Eigenschaften nun durch gezielte Genmanipulationen optimiert werden können.



5 Appendix

Literaturverzeichnis

- Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Essletzbichler P., Han S., Joung J. et al. 2017. RNA targeting with CRISPR–Cas13. *Nature*. 550(7675):280–84
- Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M. et al. 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 353(6299):aaf5573
- Allergan. 2019. Single Ascending Dose Study in Participants With LCA10. *ClinicalTrial.gov Identifier: NCT03872479*
- Allorent G. & Petroustos D. 2017. Photoreceptor-dependent regulation of photoprotection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 37:102–8
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H. et al. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 301(5633):653–57
- Anders C., Niewoehner O., Duerst A. & Jinek M. 2014. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. 513(7519):569–73
- Argos P. 1990. An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J. Mol. Biol.* 211(4):943–58
- Asamizu E. 1999. A Large Scale Structural Analysis of cDNAs in a Unicellular Green Alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Generation of 3433 Non-redundant Expressed Sequence Tags. *DNA Res.* 6(6):369–73
- Awasthi M., Ranjan P., Sharma K., Veetil S.K. & Kateriya S. 2016. The trafficking of bacterial type rhodopsins into the *Chlamydomonas* eyespot and flagella is IFT mediated. *Sci. Rep.* 6(1):34646
- Babicki S., Arndt D., Marcu A., Liang Y., Grant J.R. et al. 2016. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 44(W1):W147–53
- Baek K., Kim D.H., Jeong J., Sim S.J., Melis A. et al. 2016. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR–Cas9 ribonucleoproteins. *Sci. Rep.* 6(1):30620
- Bassett A.R., Tibbit C., Ponting C.P. & Liu J.-L. 2013. Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. *Cell Rep.* 4(1):220–28
- Beadle G.W. & Tatum E.L. 1941. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 27(11):499–506
- Beckmann M. & Hegemann P. 1991. *In Vitro* Identification of Rhodopsin in the Green Alga *Chlamydomonas*. *Biochemistry*. 30(15):3692–97
- Beel B., Müller N., Kottke T. & Mittag M. 2013. News about cryptochrome photoreceptors in algae. *Plant Signal. Behav.* 8(2):e22870
- Beel B., Prager K., Spexard M., Sasso S., Weiss D. et al. 2012. A Flavin Binding Cryptochrome Photoreceptor Responds to Both Blue and Red Light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*. 24(7):2992–3008
- Bendix S.W. 1960. Phototaxis. *Bot. Rev.* 26(2):145–208
- Berthold P., Tsunoda S.P., Ernst O.P., Mages W., Gradmann D. & Hegemann P. 2008. Channelrhodopsin-

- 1 Initiates Phototaxis and Photophobic Responses in *Chlamydomonas* by Immediate Light-Induced Depolarization. *Plant Cell*. 20(6):1665–77
- Bhaya D., Davison M. & Barrangou R. 2011. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annu. Rev. Genet.* 45(1):273–97
- Black S.J., Kashkina E., Kent T. & Pomerantz R.T. 2016. DNA Polymerase θ : A Unique Multifunctional End-Joining Machine. *Genes (Basel)*. 7(9):67
- Blitz I.L., Biesinger J., Xie X. & Cho K.W.Y. 2013. Biallelic genome modification in F⁰ *Xenopus tropicalis* embryos using the CRISPR/Cas system. *genesis*. 51(12):827–34
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S. et al. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 326(5959):1509–12
- Böhm M., Boness D., Fantisch E., Erhard H., Frauenholz J. et al. 2019. Channelrhodopsin-1 Phosphorylation Changes with Phototactic Behavior and Responds to Physiological Stimuli in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*. 31(4):886–910
- Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G. & Deisseroth K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8(9):1263–68
- Boynton J., Gillham N., Harris E., Hosler J., Johnson A. et al. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*. 240(4858):1534–38
- Brandsma I. & Gent D.C. 2012. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr.* 3(1):9
- Brouns S.J.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuis R.J.H. et al. 2008. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*. 321(5891):960–64
- Carroll D. 2016. The Development and Use of Zinc-Finger Nucleases. In *Genome Editing. Advances in Experimental Medicine and Biology*, ed. PM Cathomen T., Hirsch M., pp. 15–28. Springer, New York, NY
- Chang N., Sun C., Gao L., Zhu D., Xu X. et al. 2013. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Res*. 23(4):465–72
- Chen C., Fenk L.A. & de Bono M. 2013. Efficient genome editing in *Caenorhabditis elegans* by CRISPR-targeted homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 41(20):e193–e193
- Cho S.W., Kim S., Kim J.M. & Kim J.S. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.*
- Christie J.M. 1998. *Arabidopsis* NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science*. 282(5394):1698–1701
- Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S. et al. 2015. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 33(5):543–48
- Cole-Strauss A., Yoon K., Xiang Y., Byrne B.C., Rice M.C. et al. 1996. Correction of the Mutation Responsible for Sick Cell Anemia by an RNA-DNA Oligonucleotide. *Science*. 273(5280):1386–89
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R. et al. 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 339(6121):819–23
- Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J. et al. 2017. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. 358(6366):1019–27
- Cross F.R. & Umen J.G. 2015. The *Chlamydomonas* cell cycle. *Plant J*. 82(3):370–92
- Dangeard P. 1888. Recherches sur les algues inferieures. *Ann Sci Nat 7th Ser Bot.* 4(1):105–75
- Davis A.J. & Chen D.J. 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl. Cancer Res*. 2(3):130–43
- de Carbonnel M., Davis P., Roelfsema M.R.G., Inoue S., Schepens I. et al. 2010. The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 Protein Is a Phototropin Signaling Element That Regulates Leaf Flattening and Leaf Positioning. *Plant Physiol*. 152(3):1391–1405
- de Medeiros N.M.C., de Medeiros A.L.M., Silva H.C. & Scortecchi K.C. 2015. Recent Advances in Plant DNA Repair. In *Advances in DNA Repair*, ed. C Chen, p. 13. InTechOpen

- Deininger W., Kröger P., Hegemann U., Lottspeich F. & Hegemann P. 1995. Chlamyrodopsin represents a new type of sensory photoreceptor. *EMBO J.* 14(23):5849–58
- Deisseroth K., Feng G., Majewska A.K., Miesenbock G., Ting A. & Schnitzer M.J. 2006. Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits. *J. Neurosci.* 26(41):10380–86
- Deisseroth K. & Hegemann P. 2017. The form and function of channelrhodopsin. *Science.* 357(6356):eaan5544
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y. et al. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 471(7340):602–7
- Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonte J., Fremaux C. et al. 2008. Phage Response to CRISPR-Encoded Resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190(4):1390–1400
- DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J. & Church G.M. 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 41(7):4336–43
- Dickinson D.J., Ward J.D., Reiner D.J. & Goldstein B. 2013. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat. Methods.* 10(10):1028–34
- Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W. et al. 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 34(2):184–91
- Doench J.G., Hartenian E., Graham D.B., Tothova Z., Hegde M. et al. 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat. Biotechnol.* 32(September):1262–67
- Dokshin G.A., Ghanta K.S., Piscopo K.M. & Mello C.C. 2018. Robust Genome Editing with Short Single-Stranded and Long, Partially Single-Stranded DNA Donors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 210(3):781–87
- Dutcher S.K. 1995. Flagellar assembly in two hundred and fifty easy-to-follow steps. *Trends Genet.* 11(10):398–404
- East-Seletsky A., O'Connell M.R., Knight S.C., Burstein D., Cate J.H.D. et al. 2016. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*
- Eberhard S., Finazzi G. & Wollman F.-A. 2008. The Dynamics of Photosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 42(1):463–515
- Ebersold W.T., LEVINE R.P., Levine E.E. & OLMSTED M.A. 1962. Linkage maps In *Chlamydomonas reinhardi*. *Genetics.* 47(5):531–43
- Ebnet E., Fischer M., Deininger W. & Hegemann P. 1999. Volvoxrhodopsin, a Light-Regulated Sensory Photoreceptor of the Spheroidal Green Alga *Volvox carteri*. *Plant Cell.* 11(8):1473–84
- Ehrenberg C.G. 1834. Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Abhandlungen der Königlichen Akad. der Wissenschaften zu Berlin.* (I–XIII):145–336
- Ehrenberg C.G. 1838. Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. Ein Blick in das tiefere organische Leben der Natur. *L. Voss.*
- Engel B.D., Schaffer M., Kuhn Cuellar L., Villa E., Plitzko J.M. & Baumeister W. 2015. Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by *in situ* cryo-electron tomography. *Elife.* 4(4):
- Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., Hegemann P., Brown L.S. & Kandori H. 2014. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem. Rev.* 114(1):126–63
- Esvelt K.M., Mali P., Braff J.L., Moosburner M., Young S.J. & Church G.M. 2013. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat. Methods.* 10(11):1116–21
- Faktorová D., Nisbet R.E.R., Robledo J.A.F., Casacuberta E., Sudek L. et al. 2019. Genetic tool development in marine protists: Emerging model organisms for experimental cell biology. *bioRxiv.* 718239
- Famintzin A.S. 1866. Die Wirkung des Lichtes auf die Bewegung der *Chlamydomonas pulvisculus* Ehr., *Euglena viridis* Ehr. und *Oscillatoria insignis* Tw. *Melanges Biol. tires du Bull. l'Academie Imp. des Sci. St.-petersbg.* 73–93
- Farboud B. & Meyer B.J. 2015. Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/cas9 through improved guide RNA design. *Genetics.* 199(4):959–71

- Fedorov R., Schlichting I., Hartmann E., Domratheva T., Fuhrmann M. & Hegemann P. 2003. Crystal Structures and Molecular Mechanism of a Light-Induced Signaling Switch: The Phot-LOV1 Domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys. J.* 84(4):2474–82
- Ferenczi A., Pyott D.E., Xipnitou A. & Molnar A. 2017. Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114(51):13567–72
- Findinier J., Delevoye C. & Cohen M.M. 2019. The dynamin-like protein Fzl promotes thylakoid fusion and resistance to light stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS Genet.* 15(3):e1008047
- Foster K.W., Saranak J., Patel N., Zarilli G., Okabe M. et al. 1984. A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature.* 311(5988):756–59
- Foster K.W. & Smyth R.D. 1980. Light Antennas in phototactic algae. *Microbiol. Rev.* 44(4):572–630
- Franz S., Ignatz E., Wenzel S., Zielosko H., Putu E.P.G.N. et al. 2018. Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* 46(15):8010–22
- Fuhrmann M., Deininger W., Kateriya S. & Hegemann P. 2007. *Photoreceptors and Light Signalling*, Vol. 3. Cambridge: Royal Society of Chemistry
- Fuhrmann M., Oertel W. & Hegemann P. 1999. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 19(3):353–61
- Fuhrmann M., Stahlberg A., Govorunova E., Rank S. & Hegemann P. 2001. The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J. Cell Sci.* 114(Pt 21):3857–63
- Fujii W., Kawasaki K., Sugiura K. & Naito K. 2013. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 41(20):e187–e187
- Fujita S., Matsuo T., Ishiura M. & Kikkawa M. 2014. High-Throughput Phenotyping of *Chlamydomonas* Swimming Mutants Based on Nanoscale Video Analysis. *Biophys. J.* 107(2):336–45
- Gagnon J.A., Valen E., Thyme S.B., Huang P., Ahkmetova L. et al. 2014. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One.* 9(5):5–12
- Gallaher S.D., Fitz-Gibbon S.T., Glaesener A.G., Pellegrini M. & Merchant S.S. 2015. *Chlamydomonas* Genome Resource for Laboratory Strains Reveals a Mosaic of Sequence Variation, Identifies True Strain Histories, and Enables Strain-Specific Studies. *Plant Cell.* 27(9):2335–52
- Garneau J.E., Dupuis M.-È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R. et al. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 468(7320):67–71
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P. & Siksnys V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(39):2579–86
- Geissmann Q. 2013. OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects. *PLoS One*
- Gest H. 2004. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes Rec. R. Soc. Lond.* 58(2):187–201
- Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A. et al. 2013. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell.* 154(2):442–51
- Goodenough U. 2015. Historical perspective on *Chlamydomonas* as a model for basic research: 1950–1970. *Plant J.* 82(3):365–69
- Goodenough U., Lin H. & Lee J.-H. 2007. Sex determination in *Chlamydomonas*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18(3):350–61
- Goodstein D.M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R.D. et al. 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.*
- Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J. & Zhang F. 2018. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science.* 360(6387):439–44

- Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J. et al. 2017. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 356(6336):438–42
- Gorman D.S. & Levine R.P. 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54(6):1665–69
- Goroschankin I.N. 1875. Die Morphologie der Kryptogamen. *Vergleichende Morphologie der Pflanzen*. Prag, Verlagsbuchhandlung von Fr. Rivnac, 1.Teil:44-61
- Gratz S.J., Cummings A.M., Nguyen J.N., Hamm D.C., Donohue L.K. et al. 2013. Genome Engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. *Genetics*. 194(4):1029–35
- Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D., Thiede G., Donohue L.K. et al. 2014. Highly Specific and Efficient CRISPR/Cas9-Catalyzed Homology-Directed Repair in *Drosophila*. *Genetics*. 196(4):961–71
- Greiner A. 2014. *CRISPR / Cas9 und Zinkfinger-Nukleasen für die gezielte Genstilllegung in Chlamydomonas reinhardtii*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
- Greiner A., Kelterborn S., Evers H., Kreimer G., Sizova I. et al. 2017. Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell*. 29(10):2498–2518
- Guo J., Gaj T. & Barbas C.F. 2010. Directed Evolution of an Enhanced and Highly Efficient FokI Cleavage Domain for Zinc Finger Nucleases. *J. Mol. Biol.* 400(1):96–107
- Haeussler M., Schönig K., Eckert H., Eschstruth A., Mianné J. et al. 2016. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 17(1):148
- Hallmann A. 2011. Evolution of reproductive development in the volvocine algae. *Sex. Plant Reprod.* 24(2):97–112
- Hamel V., Steib E., Hamelin R., Armand F., Borgers S. et al. 2017. Identification of *Chlamydomonas* Central Core Centriolar Proteins Reveals a Role for Human WDR90 in Ciliogenesis. *Curr. Biol.* 27(16):2486-2498.e6
- Harrington L.B., Burstein D., Chen J.S., Paez-Espino D., Ma E. et al. 2018. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*. 362(6416):839–42
- Harris E.H. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52(1):363–406
- Harz H. & Hegemann P. 1991. Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*. *Nature*. 351(6326):489–91
- Harz H., Nonnengasser C., Hegemann P., Trans P. & Lond R.S. 1992. The photoreceptor current of the green alga *Chlamydomonas*. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 338(1283):39–52
- Hegemann P. 2008. Algal sensory photoreceptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:167–89
- Heigwer F., Kerr G. & Boutros M. 2014. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat. Methods*. 11(2):122–23
- Herrin D.L. & Nickelsen J. 2004. Chloroplast RNA processing and stability. *Photosynth. Res.* 82(3):301–14
- Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., Thakore P.I., Crawford G.E. et al. 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.* 33(5):510–17
- Hirano H., Gootenberg J.S., Horii T., Abudayyeh O.O., Kimura M. et al. 2016. Structure and Engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*. 164(5):950–61
- Holland E.M., Braun F.J., Nonnengässer C., Harz H. & Hegemann P. 1996. The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. I. Kinetics and influence of divalent ions. *Biophys. J.* 70(2):924–31
- Holland E.M., Harz H., Uhl R. & Hegemann P. 1997. Control of phobic behavioral responses by rhodopsin-induced photocurrents in *Chlamydomonas*. *Biophys. J.* 73(3):1395–1401
- Holliday R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5:282–304
- Hooke R. 1665. *Micrographia: Or, Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses*. John Martyn, Royal Society, London

- Hopp T.P., Prickett K.S., Price V.L., Libby R.T., March C.J. et al. 1988. A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Bio/Technology*. 6(10):1204–10
- Hou Z., Zhang Y., Propson N.E., Howden S.E., Chu L.-F. et al. 2013. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(39):15644–49
- Hu J.H., Miller S.M., Geurts M.H., Tang W., Chen L. et al. 2018. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*. 556(7699):57–63
- Hu X., Chang N., Wang X., Zhou F., Zhou X. et al. 2013. Heritable gene-targeting with gRNA/Cas9 in rats. *Cell Res.* 23(11):1322–25
- Huang K. & Beck C.F. 2003. Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(10):6269–74
- Huang K., Kunkel T. & Beck C.F. 2004. Localization of the Blue-Light Receptor Phototropin to the Flagella of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biol. Cell.* 15(8):3605–14
- Huang K., Merkle T. & Beck C.F. 2002. Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the phototropin family. *Physiol. Plant.* 115(4):613–22
- Hubbard K. & Dodd A. 2016. Rhythms of Life: The Plant Circadian Clock. *Plant Cell.* 28(4):tpc.116.tt0416
- Hur J.K., Kim K., Been K.W., Baek G., Ye S. et al. 2016. Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 34(8):807–8
- Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Tsai S.Q. et al. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31(3):227–29
- Ibraheim R., Song C.-Q., Mir A., Amrani N., Xue W. & Sontheimer E.J. 2018. All-in-one adeno-associated virus delivery and genome editing by *Neisseria meningitidis* Cas9 *in vivo*. *Genome Biol.* 19(1):137
- Infante A., Lo S. & Hall J.L. 1995. A *Chlamydomonas* genomic library in yeast artificial chromosomes. *Genetics.* 141(1):87–93
- Iwai M., Roth M.S. & Niyogi K.K. 2018. Subdiffraction-resolution live-cell imaging for visualizing thylakoid membranes. *Plant J.* 96(1):233–43
- Jarillo J.A., Gabrys H., Capel J., Alonso J.M., Ecker J.R. & Cashmore A.R. 2001. Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature.* 410(6831):952–54
- Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F. & Marraffini L.A. 2013a. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.*
- Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B. & Weeks D.P. 2013b. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41(20):e188–e188
- Jiang W.Z. & Weeks D.P. 2017. A gene-within-a-gene Cas9/sgRNA hybrid construct enables gene editing and gene replacement strategies in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* 26:474–80
- 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):816–21
- Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E. & Doudna J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife.* 2:e00471
- Kagawa T. 2001. Arabidopsis NPL1: A Phototropin Homolog Controlling the Chloroplast High-Light Avoidance Response. *Science.* 291(5511):2138–41
- Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A. et al. 2015. Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biol.* 16(1):1–13
- Kasahara M., Swartz T.E., Olney M.A., Onodera A., Mochizuki N. et al. 2002. Photochemical Properties of the Flavin Mononucleotide-Binding Domains of the Phototropins from Arabidopsis, Rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 129(2):762–73
- Kateriya S. 2004. *Identification, Expression and Characterization of Archaeal-Type Opsins of Chlamydomonas reinhardtii*. Dissertation, Universität Regensburg

- Kato H.E., Zhang F., Yizhar O., Ramakrishnan C., Nishizawa T. et al. 2012. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*. 482(7385):369–74
- KC R., Srivastava A., Wilkowski J.M., Richter C.E., Shavit J.A. et al. 2016. Detection of nucleotide-specific CRISPR/Cas9 modified alleles using multiplex ligation detection. *Sci. Rep.* 6(1):32048
- Kearns N.A., Pham H., Tabak B., Genga R.M., Silverstein N.J. et al. 2015. Functional annotation of native enhancers with a Cas9–histone demethylase fusion. *Nat. Methods*. 12(5):401–3
- Kelterborn S. 2013. *RNA-guided genome editing in Chlamydomonas reinhardtii using the CRISPR system*. Masterarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Kelterborn S., Boehning F., Evers H., Sizova I., Baidukova O. & Hegemann P. 2020. Gene editing in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. In *Methods in Molecular Biology - Plant Synthetic Biology*, ed. M Zurbriggen. Springer US - im Editoriat
- Keppler A., Gendreizig S., Gronemeyer T., Pick H., Vogel H. & Johnsson K. 2003. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 21(1):86–89
- Kim E., Koo T., Park S.W., Kim D., Kim K. et al. 2017. *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat. Commun.* 8(1):14500
- Kim J.-S., Cho S.W., Kim S.-T., Kim H., Woo J.W. et al. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 33(11):1162–64
- Kim S., Kim D., Cho S.W., Kim J. & Kim J.S. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24(6):1012–19
- Kim Y.G., Cha J. & Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *FokI* cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:1156–60
- Kim Y.G. & Chandrasegaran S. 1994. Chimeric restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91(3):883–87
- Kindle K.L. 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(3):1228–32
- Kinoshita T., Doi M., Suetsugu N., Kagawa T., Wada M. & Shimazaki K. 2001. phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*. 414(6864):656–60
- Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T. et al. 2016. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 529(7587):490–95
- Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V. V., Nguyen N.T. et al. 2015. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 523(7561):481–85
- Kondo S. & Ueda R. 2013. Highly Improved Gene Targeting by Germline-Specific Cas9 Expression in *Drosophila*. *Genetics*. 195(3):715–21
- Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O. et al. 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*. 517(7536):583–88
- Konermann S., Lotfy P., Brideau N.J., Oki J., Shokhirev M.N. & Hsu P.D. 2018. Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell*. 173(3):665–676.e14
- Kottke T., Oldemeyer S., Wenzel S., Zou Y. & Mittag M. 2017. Cryptochrome photoreceptors in green algae: Unexpected versatility of mechanisms and functions. *J. Plant Physiol.* 217:4–14
- Kozuka T., Kong S.-G., Doi M., Shimazaki K. & Nagatani A. 2011. Tissue-Autonomous Promotion of Palisade Cell Development by Phototropin 2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23(10):3684–95
- Kreis C.T., Le Blay M., Linne C., Makowski M.M. & Bäumchen O. 2018. Adhesion of *Chlamydomonas* microalgae to surfaces is switchable by light. *Nat. Phys.* 14(1):45–49
- Krokan H.E. & Bjoras M. 2013. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(4):a012583–a012583
- Kropat J., Hong-Hermesdorf A., Casero D., Ent P., Castruita M. et al. 2011. A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 66(5):770–80
- Lander E.S., Baylis F., Zhang F., Charpentier E., Berg P. et al. 2019. Adopt a moratorium on heritable genome editing. *Nature*. 567(7747):165–68

- Lehtreck K.F. 2015. IFT–Cargo Interactions and Protein Transport in Cilia. *Trends Biochem. Sci.* 40(12):765–78
- Lederberg J. & Tatum E.L. 1946. Gene Recombination in *Escherichia Coli*. *Nature*. 158(4016):558–558
- Leptos K.C., Chioccioli M., Furlan S., Pesci A.I. & Goldstein R.E. 2018. An Adaptive Flagellar Photoresponse Determines the Dynamics of Accurate Phototactic Steering in *Chlamydomonas*. *bioRxiv*. 254714
- Levine R.P. 1969. The Analysis of Photosynthesis Using Mutant Strains of Algae and Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 20(1):523–40
- Lewin R.A. 1956. Control of Sexual Activity in *Chlamydomonas* by Light. *J. Gen. Microbiol.* 15(1):170–85
- Li G., Zhang X., Zhong C., Mo J., Quan R. et al. 2017. Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells. *Sci. Rep.* 7(1):8943
- Li J.-F.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D. et al. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat. Biotechnol.* 31(8):688–91
- Li X., Patena W., Fauser F., Jinkerson R.E., Saroussi S. et al. 2019. A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photosynthesis. *Nat. Genet.* 51(4):627–35
- Li X., Zhang R., Patena W., Gang S.S., Blum S.R. et al. 2016. An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell.* 28(2):367–87
- Liang X., Potter J., Kumar S., Ravinder N. & Chesnut J.D. 2017a. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J. Biotechnol.* 241:136–46
- Liang Z., Chen K., Li T., Zhang Y., Wang Y. et al. 2017b. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 8(1):14261
- Lieber M.R. 2010. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79(1):181–211
- Lin S., Staahl B.T., Alla R.K. & Doudna J.A. 2014. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*. 3:e04766
- Liu D., Wang Z., Xiao A., Zhang Y., Li W. et al. 2014. Efficient Gene Targeting in Zebrafish Mediated by a Zebrafish-Codon-Optimized Cas9 and Evaluation of Off-Targeting Effect. *J. Genet. Genomics.* 41(1):43–46
- Liu H., Ding Y., Zhou Y., Jin W., Xie K. & Chen L.-L. 2017. CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. *Mol. Plant.* 10(3):530–32
- Liu H., Liu B., Zhao C., Pepper M. & Lin C. 2011. The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci.* 16(12):684–91
- Liu J.-J., Orlova N., Oakes B.L., Ma E., Spinner H.B. et al. 2019. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature*. 566(7743):218–23
- Liu X.S., Wu H., Ji X., Stelzer Y., Wu X. et al. 2016. Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell.* 167(1):233–247.e17
- Lohr M., Im C.-S. & Grossman A.R. 2005. Genome-Based Examination of Chlorophyll and Carotenoid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 138(1):490–515
- Luck M. 2018. *Erstcharakterisierung von Histidinkinase-Rhodopsinen aus einzelligen Grünalgen*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
- Luck M. & Hegemann P. 2017. The two parallel photocycles of the *Chlamydomonas* sensory photoreceptor histidine kinase rhodopsin 1. *J. Plant Physiol.* 217:77–84
- Luck M., Mathes T., Bruun S., Fudim R., Hagedorn R. et al. 2012. A Photochromic Histidine Kinase Rhodopsin (HKR1) That Is Bimodally Switched by Ultraviolet and Blue Light. *J. Biol. Chem.* 287(47):40083–90
- Lumbreras V., Stevens D.R. & Purton S. 1998. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J.* 14(4):441–47

- Luntz A. 1931a. Untersuchungen über die Phototaxis. I. Mitteilung: Die absoluten Schwellenwerte und die relative Wirksamkeit von Spektralfarben bei grünen und farblosen Einzelligen. *Zeit. Vergl. Physiol.* 14:68–92
- Luntz A. 1931b. Untersuchungen über die Phototaxis. II. Mitteilung: Lichtintensität und Schwimmergeschwindigkeit bei *Eudorina elegans*. *Zeit. Vergl. Physiol.* 15:652–78
- Mackinder L.C.M., Chen C., Leib R.D., Patena W., Blum S.R. et al. 2017. A Spatial Interactome Reveals the Protein Organization of the Algal CO₂-Concentrating Mechanism. *Cell.* 171(1):133-147.e14
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M. et al. 2013. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science.* 339(6121):823–26
- Mao Y., Botella J.R., Liu Y. & Zhu J.-K. 2019. Gene editing in plants: progress and challenges. *Natl. Sci. Rev.* 6(3):421–37
- Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R. & Ploegh H.L. 2015. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol.* 33(5):538–42
- Mashiko D., Fujihara Y., Satouh Y., Miyata H., Isotani A. & Ikawa M. 2013. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.* 3(1):3355
- Mast S.O. 1927. Structure and function of the eye-spot in unicellular and colonial organisms. *Arch. Protistenk.* 60:197–220
- Matsuo T. & Ishiura M. 2011. *Chlamydomonas reinhardtii* as a new model system for studying the molecular basis of the circadian clock. *FEBS Lett.* 585(10):1495–1502
- Matsuo T., Okamoto K., Onai K., Niwa Y., Shimogawara K. & Ishiura M. 2008. A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes Dev.* 22(7):918–30
- McClung C.R. 2006. Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell Online.* 18(4):792–803
- Meeske A.J. & Marraffini L.A. 2018. RNA Guide Complementarity Prevents Self-Targeting in Type VI CRISPR Systems. *Mol. Cell*
- Merchant S.S., Kropat J., Liu B., Shaw J. & Warakanont J. 2012. TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23(3):352–63
- Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J. et al. 2007. The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science.* 318(5848):245–50
- Miller J.C., Holmes M.C., Wang J., Guschin D.Y., Lee Y.-L. et al. 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 25(7):778–85
- Miller R., Wu G., Deshpande R.R., Vieler A., Gärtner K. et al. 2010. Changes in Transcript Abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism. *Plant Physiol.* 154(4):1737–52
- Mitchell A.L., Attwood T.K., Babbitt P.C., Blum M., Bork P. et al. 2019. InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* 47(D1):D351–60
- Mittag M. & Wagner V. 2003. The Circadian Clock of the Unicellular Eukaryotic Model Organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biol. Chem.* 384(5):689–95
- Mittelmeier T.M., Boyd J.S., Lamb M.R. & Dieckmann C.L. 2011. Asymmetric properties of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytoskeleton direct rhodopsin photoreceptor localization. *J. Cell Biol.* 193(4):741–53
- Moewus F. 1938. Vererbung des Geschlechts bei *Chlamydomonas eugametos* und verwandten Arten. *Biol. Zbl.* 58:516–36
- Moewus F. 1940a. Über Mutationen der Sexual-Gene bei *Chlamydomonas*. *Biol. Zbl.* 60:597–626
- Moewus F. 1940b. Die Analyse von 42 erblichen Eigenschaften der *Chlamydomonas eugametos*. *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungslehre.* 78:418–62
- Molnar A., Bassett A., Thuenemann E., Schwach F., Karkare S. et al. 2009. Highly specific gene silencing

- by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 58(1):165–74
- Moreno-Mateos M.A., Vejnar C.E., Beaudoin J.-D., Fernandez J.P., Mis E.K. et al. 2015. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. *Nat. Methods.* 12(10):982–88
- Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J. & Bridges C.B. 1915. *The Mechanism of Mendelian Heredity*. New York: Henry Holt and Company
- Moscou M.J. & Bogdanove A.J. 2009. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science.* 326(5959):1501–1501
- Müller N., Wenzel S., Zou Y., Künzel S., Sasso S. et al. 2017. A Plant Cryptochrome Controls Key Features of the *Chlamydomonas* Circadian Clock and Its Life Cycle. *Plant Physiol.* 174(1):185–201
- Müller O. 1786. *Animalcula Infusoria Fluviatilia et Marina*. Hauniae: Typis Nicolai Mölleri
- Nagai T., Ibata K., Park E.S., Kubota M., Mikoshiba K. & Miyawaki A. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20(1):87–90
- Nagel G., Ollig D., Fuhrmann M., Kateriya S., Musti A.M. et al. 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science.* 296(5577):2395–98
- Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N. et al. 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(24):13940–45
- Nakayama T., Fish M.B., Fisher M., Oomen-Hajagos J., Thomsen G.H. & Grainger R.M. 2013. Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis.* 51(12):835–43
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D.G.G. & Kamoun S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31(8):691–93
- Nellaepalli S., Ozawa S.I., Kuroda H. & Takahashi Y. 2018. The photosystem I assembly apparatus consisting of Ycf3-Y3IP1 and Ycf4 modules. *Nat. Commun.* 9(1):
- Nelles D.A., Fang M.Y., O’Connell M.R., Xu J.L., Markmiller S.J. et al. 2016. Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9. *Cell.* 165(2):488–96
- Nelson J.A. & Lefebvre P.A. 1995. Targeted disruption of the *NIT8* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Biol.* 15(10):5762–69
- Nepagene. 2013. *NEPA21 Electroporation of Chlamydomonas*. www.nepagene.jp
- Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I. et al. 2014. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell.* 156(5):935–49
- Nishimasu H., Shi X., Ishiguro S., Gao L., Hirano S. et al. 2018. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science.* 361(6408):1259–62
- Niwa Y., Matsuo T., Onai K., Kato D., Tachikawa M. & Ishiura M. 2013. Phase-resetting mechanism of the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(33):13666–71
- Oldemeyer S., Franz S., Wenzel S., Essen L.-O., Mittag M. & Kottke T. 2016. Essential Role of an Unusually Long-lived Tyrosyl Radical in the Response to Red Light of the Animal-like Cryptochrome aCRY. *J. Biol. Chem.* 291(27):14062–71
- Oldemeyer S., Mittag M. & Kottke T. 2019. Time-Resolved Infrared and Visible Spectroscopy on Cryptochrome aCRY: Basis for Red Light Reception. *Biophys. J.* 117(3):490–99
- Orm M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y. & Remington S.J. 1996. Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science.* 273(5280):1392–95
- Ozawa S., Nield J., Terao A., Stauber E., Hippler M. et al. 2009. Biochemical and Structural Studies of the Large Ycf4-Photosystem I Assembly Complex of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell.* 21(8):2424–42
- Pan J.M., Haring M.A. & Beck C.F. 1997. Characterization of Blue Light Signal Transduction Chains That Control Development and Maintenance of Sexual Competence in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 115(3):1241–49
- Pavletich N. & Pabo C. 1991. Zinc finger–DNA recognition: crystal structure of a Zif268–DNA complex at 2.1 Å. *Science.* 252(5007):809–17

- Pavletich N. & Pabo C. 1993. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science*. 261(5129):1701–7
- Penzkofer A., Luck M., Mathes T. & Hegemann P. 2014. Bistable Retinal Schiff Base Photodynamics of Histidine Kinase Rhodopsin HKR1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photochem. Photobiol.* 90(4):n/a-n/a
- Petersen J.L. 2001. A gene required for the novel activation of a class II DNA photolyase in *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res.* 29(21):4472–81
- Petersen J.L., Lang D.W. & Small G.D. 1999. Cloning and characterization of a class II DNA photolyase from *Chlamydomonas*. *Plant Mol. Biol.* 40(6):1063–71
- Petroutsos D., Tokutsu R., Maruyama S., Flori S., Greiner A. et al. 2016. A blue-light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis. *Nature*. 537(7621):563–66
- Pierce A.J. 2001. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* 15(24):3237–42
- Plazzo A.P., De Franceschi N., Da Broi F., Zonta F., Sanasi M.F. et al. 2012. Bioinformatic and Mutational Analysis of Channelrhodopsin-2 Protein Cation-conducting Pathway. *J. Biol. Chem.* 287(7):4818–25
- Proschold T. 2005. Portrait of a Species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*. 170(4):1601–10
- Pröschold T. & Silva P.C. 2007. (1768) Proposal to change the listed type of *Chlamydomonas* Ehrenb., nom. cons. (*Chlorophyta*). *Taxon*. 56(2):595–96
- Puchta H. & Fauser F. 2013. Gene targeting in plants: 25 years later. *Int. J. Dev. Biol.* 57(6–7–8):629–37
- Ran F.A., Cong L., Yan W.X., Scott D. a., Gootenberg J.S. et al. 2015. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 520(7546):186–91
- Raper A.T., Stephenson A.A. & Suo Z. 2018. Functional Insights Revealed by the Kinetic Mechanism of CRISPR/Cas9. *J. Am. Chem. Soc.* 140(8):2971–84
- Rees H.A. & Liu D.R. 2018. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat. Rev. Genet.* 19(12):770–88
- Reinhardt L. 1876. Die Copulation der Zoosporen bei *Chlamydomonas pulvisculus* Ehrb. und *Stigeoclonium* sp. *Arb. der Naturforscher-Gesellschaft an der Univ. zu Charkoff*. Band X:
- Remacle C., Cardol P., Coosemans N., Gaisne M. & Bonnefoy N. 2006. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(12):4771–76
- Ren X., Sun J., Housden B.E., Hu Y., Roesel C. et al. 2013. Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(47):19012–17
- Ren X., Yang Z., Xu J., Sun J., Mao D. et al. 2014. Enhanced Specificity and Efficiency of the CRISPR/Cas9 System with Optimized sgRNA Parameters in *Drosophila*. *Cell Rep.* 9(3):1151–62
- Richardson C.D., Ray G.J., DeWitt M.A., Curie G.L. & Corn J.E. 2016. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* 34(3):339–44
- Robert F., Barbeau M., Éthier S., Dostie J. & Pelletier J. 2015. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Med.* 7(1):93
- Rochaix J.D. 1995. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu. Rev. Genet.* 29:209–30
- Rochaix J.D. & Malnoe P. 1978. Anatomy of the chloroplast ribosomal DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell*. 15(2):661–70
- Rohr J., Sarkar N., Balenger S., Jeong B.R. & Cerutti H. 2004. Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 40(4):611–21
- Roldán-Arjona T. & Ariza R.R. 2009. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 681(2–3):169–79
- Roth T.L., Milenkovic L. & Scott M.P. 2014. A Rapid and Simple Method for DNA Engineering Using Cycled Ligation Assembly. *PLoS One*. 9(9):e107329

- Rudin N. & Haber J.E. 1988. Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in *Saccharomyces cerevisiae* by recombination between flanking homologous sequences. *Mol. Cell. Biol.* 8(9):3918–28
- Rüffer U. & Nultsch W. 1985. High-speed cinematographic analysis of the movement of *Chlamydomonas*. *Cell Motil.* 5(3):251–63
- Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T.E., Christie J.M. et al. 2001. *Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(12):6969–74
- Salomé P.A. & Merchant S.S. 2019. A Series of Fortunate Events: Introducing *Chlamydomonas* as a Reference Organism. *Plant Cell.* 31(8):1682–1707
- Sapp J. 1987. What counts as evidence or who was Franz Moewus and why was everybody saying such terrible things about him? *Hist. Philos. Life Sci.* 9(2):277–308
- Sapranaukas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P. & Siksnys V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 39(21):9275–82
- Sasso S., Stibor H., Mittag M. & Grossman A.R. 2018. From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *Elife.* 7:e39233
- Scherer S. & Davis R.W. 1979. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76(10):4951–55
- Schmidt M., Gessner G., Luff M., Heiland I., Wagner V. et al. 2006. Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements. *Plant Cell.* 18(8):1908–30
- Schmollinger S., Strenkert D. & Schroda M. 2010. An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Curr. Genet.* 56:383–89
- Schneider F., Grimm C. & Hegemann P. 2015. Biophysics of Channelrhodopsin. *Annu. Rev. Biophys.* 44(1):167–86
- Schroda M., Beck C.F. & Vallon O. 2002. Sequence elements within an *HSP70* promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 31(4):445–55
- Schroda M., Blocker D. & Beck C.F. 2000. The *HSP70A* promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 21(2):121–31
- Schröpfer S., Knoll A., Trapp O. & Puchta H. 2014. DNA Repair and Recombination in Plants. In *Molecular Biology*, pp. 51–93. New York, NY: Springer
- Scranton M.A., Ostrand J.T., Fields F.J. & Mayfield S.P. 2015. *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *Plant J.* 82(3):523–31
- Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K. et al. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31(8):686–88
- Shao S., Ren C., Liu Z., Bai Y., Chen Z. et al. 2017. Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 92:43–52
- Shin S.-E., Lim J.-M., Koh H.G., Kim E.K., Kang N.K. et al. 2016. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 6(1):27810
- Shin Y.S., Jeong J., Nguyen T.H.T., Kim J.Y.H., Jin E. & Sim S.J. 2019. Targeted knockout of phospholipase A2 to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 271:368–74
- Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N. et al. 2017. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 15(3):169–82
- Shy B.R., Macdougall M.S., Clarke R. & Merrill B.J. 2016. Co-incident insertion enables high efficiency genome engineering in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 44(16):7997–8010
- Sineshchekov O.A., Jung K.-H. & Spudich J.L. 2002. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(13):8689–94

- Sizova I., Fuhrmann M. & Hegemann P. 2001. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*. 277(1–2):221–29
- Sizova I., Greiner A., Awasthi M., Kateriya S. & Hegemann P. 2013. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J*. 73(5):873–82
- Smargon A.A., Cox D.B.T., Pyzocha N.K., Zheng K., Slaymaker I.M. et al. 2017. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. *Mol. Cell*. 65(4):618–630.e7
- Smith G.M. & Regnery D.C. 1950. Inheritance of Sexuality in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 36(4):246–48
- Snell W.J., Pan J. & Wang Q. 2004. Cilia and flagella revealed: from flagellar assembly in *Chlamydomonas* to human obesity disorders. *Cell*. 117(6):693–97
- Sodeinde O.A. & Kindle K.L. 1993. Homologous recombination in the nuclear genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(19):9199–9203
- Solaro P.C., Birkenkamp K., Pfeiffer P. & Kemper B. 1993. Endonuclease VII of Phage T4 Triggers Mismatch Correction *in Vitro*. *J. Mol. Biol.* 230(3):868–77
- Song J., Yang D., Xu J., Zhu T., Chen Y.E. & Zhang J. 2016. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat. Commun.* 7(1):10548
- Spexard M., Thöing C., Beel B., Mittag M. & Kottke T. 2014. Response of the sensory animal-like cryptochrome aCRY to blue and red light as revealed by infrared difference spectroscopy. *Biochemistry*. 53(6):1041–50
- Stehfest K. & Hegemann P. 2010. Evolution of the channelrhodopsin photocycle model. *ChemPhysChem*. 11(6):1120–26
- Stemmer M., Thumberger T., del Sol Keyer M., Wittbrodt J. & Mateo J.L. 2015. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One*. 10(4):e0124633
- Stevens D.R., Rochaix J.D. & Purton S. 1996. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol. Gen. Genet.* 251(1):23–30
- Strecker J., Jones S., Koopal B., Schmid-Burgk J., Zetsche B. et al. 2019. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat. Commun.* 10(1):212
- Strenkert D., Schmollinger S., Gallaher S.D., Salomé P.A., Purvine S.O. et al. 2019. Multiomics resolution of molecular events during a day in the life of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116(6):2374–83
- Suzuki T., Yamasaki K., Fujita S., Oda K., Iseki M. et al. 2003. Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: Model structure and intracellular localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301(3):711–17
- Tan W., Carlson D.F., Lancto C.A., Garbe J.R., Webster D.A. et al. 2013. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(41):16526–31
- Teng F., Cui T., Feng G., Guo L., Xu K. et al. 2018. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov.* 4(1):63
- Thomas K.R. & Capecchi M.R. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51(3):503–12
- Thompson M.D. 2016. *Channelrhodopsin-1: Cellular Localization and Role in Eyespot Assembly and Placement in Chlamydomonas reinhardtii*. Dissertation, The University of Arizona
- Tian Y., Gao S., von der Heyde E.L., Hallmann A. & Nagel G. 2018. Two-component cyclase opsins of green algae are ATP-dependent and light-inhibited guanylyl cyclases. *BMC Biol.* 16(1):144
- Treviranus L.C. 1817. Die Bewegung der Grünen Materie im Pflanzenreiche. *Vermischte Schriften Anat. und Physiol. Inhalts.* Bd. 2:73–93
- Trippens J., Greiner A., Schellwat J., Neukam M., Rottmann T. et al. 2012. Phototropin Influence on Eyespot Development and Regulation of Phototactic Behavior in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*. 24(11):4687–4702
- Tsunoda S.P. & Hegemann P. 2009. Glu 87 of Channelrhodopsin-1 Causes pH-dependent Color Tuning

- and Fast Photocurrent Inactivation. *Photochem. Photobiol.* 85(2):564–69
- Tzur Y.B., Friedland A.E., Nadarajan S., Church G.M., Calarco J.A. & Colaiácovo M.P. 2013. Heritable Custom Genomic Modifications in *Caenorhabditis elegans* via a CRISPR–Cas9 System. *Genetics.* 195(3):1181–85
- Uhl R. & Hegemann P. 1990. Probing visual transduction in a plant cell. *Biophys. J.* 58(5):1295–1302
- Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A. & Tuli R. 2013. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda).* 3(12):2233–38
- Vouillot L., Th  lie A. & Pollet N. 2015. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda).* 5(3):407–15
- Waaaijers S., Portegijis V., Kerver J., Lemmens B.B.L.G., Tijsterman M. et al. 2013. CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 195(3):1187–91
- Wang G., Levy D.D., Seidman M.M. & Glazer P.M. 1995. Targeted mutagenesis in mammalian cells mediated by intracellular triple helix formation. *Mol. Cell. Biol.* 15(3):1759–68
- Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W. et al. 2013. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell.* 153(4):910–18
- Wang T., Wei J.J., Sabatini D.M. & Lander E.S. 2014. Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR–Cas9 System. *Science.* 343(6166):80–84
- Wang Y., Stessman D.J. & Spalding M.H. 2015. The CO₂ concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO₂: how *Chlamydomonas* works against the gradient. *Plant J.* 82(3):429–48
- Wilson L.O.W., O'Brien A.R. & Bauer D.C. 2018. The Current State and Future of CRISPR-Cas9 gRNA Design Tools. *Front. Pharmacol.* 9:749
- Witman G.B., Carlson K., Berliner J. & Rosenbaum J.L. 1972. *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Biol.* 54(3):507–39
- Wood R.D., Araujo S.J., Ariza R.R., Batty D.P., Biggerstaff M. et al. 2000. DNA Damage Recognition and Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65:173–82
- Wykoff D.D., Grossman A.R., Weeks D.P., Usuda H. & Shimogawara K. 1999. Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(26):15336–41
- Xiao A., Wang Z., Hu Y., Wu Y., Luo Z. et al. 2013. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* 41(14):e141–e141
- Xie K. & Yang Y. 2013. RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System. *Mol. Plant.* 6(6):1975–83
- Xu H., Xiao T., Chen C.-H., Li W., Meyer C.A. et al. 2015a. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res.* 25(8):1147–57
- Xu K., Ren C., Liu Z., Zhang T., Zhang T. et al. 2015b. Efficient genome engineering in eukaryotes using Cas9 from *Streptococcus thermophilus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 72(2):383–99
- Yamano T., Iguchi H. & Fukuzawa H. 2013. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J. Biosci. Bioeng.* 115(6):691–94
- Yang H., Wang H., Shivalila C.S., Cheng A.W., Shi L. & Jaenisch R. 2013. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell.* 154(6):1370–79
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S. & Madden T.L. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13(1):134
- Yu Z., Ren M., Wang Z., Zhang B., Rong Y.S. et al. 2013. Highly Efficient Genome Modifications Mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics.* 195(1):289–91
- Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S. et al. 2015. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR–Cas System. *Cell.* 163(3):759–71
- Zhang F. 2019. Development of CRISPR–Cas systems for genome editing and beyond. *Q. Rev. Biophys.* 52:e6

- Zhang Z., Shrager J., Jain M., Chang C., Vallon O. & Grossman A.R. 2004. Insights into the Survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during Sulfur Starvation Based on Microarray Analysis of Gene Expression. *Eukaryot. Cell.* 3(5):1331–48
- Zhao T., Wang W., Bai X. & Qi Y. 2009. Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 58(1):157–64
- Zorin B., Hegemann P. & Sizova I. 2005. Nuclear-gene targeting by using single-stranded DNA avoids illegitimate DNA integration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell.* 4(7):1264–72
- Zorin B., Lu Y., Sizova I. & Hegemann P. 2009. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* as exemplified by disruption of the PHOT gene. *Gene.* 432(1–2):91–96
- Zou Y., Wenzel S., Müller N., Prager K., Jung E.-M. et al. 2017. An Animal-Like Cryptochrome Controls the *Chlamydomonas* Sexual Cycle. *Plant Physiol.* 174(3):1334–47
- Zschieschang E. 2018. *Epitope and Fluorescent tagging of photoreceptor genes via CRISPR/Cas9 in C. reinhardtii*. Masterarbeit, Humboldt Universität zu Berlin
- Zuris J.A., Thompson D.B., Shu Y., Guilinger J.P., Bessen J.L. et al. 2015. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 33(1):73–80



Abbildungsverzeichnis

Alle Abbildungen ohne Kennzeichnung wurden vom Autor selbst erstellt.

Abbildung 1.1: Historische Experimente an Grünalgen.....	2
A) Entnommen aus dem Bildatlas zu " <i>Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. Ein Blick in das tiefere organische Leben der Natur</i> " (Ehrenberg 1838, Atlas, Tafel III, Bild X). Das Bildmaterial wurde von der <i>Harvard University, Museum of Comparative Zoology, Ernst Mayr Library</i> am 6. Januar 2015 eingescannt und über das <i>Internet Archive</i> (https://archive.org/details/InfusionsthiercAtlaEhre/) bereitgestellt. Die Abbildung ist gemeinfrei (Public Domain) (https://creativecommons.org/publicdomain/mark/1.0/deed.de)	
B) Die Abbildung wurde vom Autor erstellt und ist in Teilen in " <i>The form and function of channelrhodopsin</i> " (Deisseroth & Hegemann 2017) als Abbildung 2B erschienen. Mit Genehmigung der AAAS reproduziert.	
Abbildung 1.2: Die Grünalge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5
A) Das Mikroskopie-Bild wurde von Georg Kreimer aufgenommen und ist in Greiner 2017 (Abbildung 4E) veröffentlicht. Das Bildmaterial unterliegt dem Copyright der <i>American Society of Plant Biologists</i> .	
B) Die Abbildung wurde von Debbie Maizels erstellt und ist in Sasso et al. (2018) erschienen. Die Abbildung unterliegt der Creative Commons Lizenz CC BY 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode)	
Abbildung 1.3 Übersicht und Architektur der vorhergesagten Photorezeptorgene in <i>C. reinhardtii</i>	6
Abbildung 1.4: Expression von <i>COP1/2</i> im 24-Stunden Nacht-Tag-Rhythmus.....	8
Abbildung 1.5: Expressionsprofil der Photorezeptoren in <i>C. reinhardtii</i>	11
Abbildung 1.6: Programmierbare Nukleasen als Methode zur Genveränderung.....	14
Abbildung 1.7: Funktionsweise der CRISPR/Cas-Abwehrsysteme.....	15
Abbildung entnommen und übersetzt aus Bhaya et al. (2011), reproduziert mit Genehmigung von <i>Annual Reviews, Inc.</i>	
Abbildung 1.8: Funktionsweise der Cas9-, Cas12a- und Cas13a-Nuklease.....	20
Abbildung 1.9: Reparaturmechanismen nach einem DNA-Doppelstrangbruch.....	27
Abbildung 2.1: Oligonukleotid-Klonierung in die <i>aphVIII</i> -Testkassette.....	36
Abbildung 2.2: Klonierung der <i>COP1/2</i> -ZFN-Plasmide.....	39
Abbildung 2.3: Aufbau der FLAG-Donor-DNAs.....	42
Abbildung 2.4: Transformation von <i>C. reinhardtii</i> -Zellen mit der Glasperlen-Methode.....	44
Abbildung 2.5: Transformation von ZFN-Plasmiden durch Elektroporation.....	45
Abbildung 2.6: Herstellung der Cas9-gRNA Ribonukleoprotein-Komplexe.....	46
Abbildung 2.7: Elektroporation von <i>C. reinhardtii</i> -Zellen mit Cas9-RNPs.....	47
Abbildung 2.8: Ablauf der Klonanalyse.....	51
Abbildung 2.9: Screening-PCRs.....	52
Abbildung 2.10: Identifikation von Mutanten durch die kurze Locus-PCR.....	53
Abbildung 2.11: Identifikation von Mutanten durch die FLAG-PCR.....	54
Abbildung 3.1: Schema der <i>aphVIII</i> *-Reparatursystems zum Testen neuer Nukleasen.....	61

Abbildung 3.2: Elektroporation von ZFNs in motilen <i>C. reinhardtii</i> -Stämmen.....	63
Abbildung 3.3: Das FLAG-Screening.....	65
Abbildung 3.4: Geninaktivierung mit Zinkfingernukleasen.....	67
Abbildung 3.5: Phototaxismessungen der <i>ChR</i> -Mutanten.....	70
Teile dieser Abbildung sind in veränderter Form in Greiner <i>et al.</i> (2017, Abbildung 4A+B) erschienen und unterliegen dem Copyright der <i>American Society of Plant Biologists</i> .	
Abbildung 3.6: Etablierung von Cas9-RNPs mit dem <i>aphVIII</i> -Reparatursystem.....	74
Abbildung 3.7: Geninaktivierung von <i>COP1/2</i> durch unterschiedliche Donorsubstrate.....	76
Abbildung 3.8: Geninaktivierung mittels Cas9-Ribonukleoproteinen (RNPs).....	77
Abbildung 3.9: Einführung von Protein-Tags.....	79
Abbildung 3.10: Der Blau-Grün-Test zur schnellen Identifikation von Mutanten.....	83
Abbildung 3.11: Analyse der Homologie-vermittelten Reparatur (HDR).....	85
Abbildung 4.1: Evaluierung von Cas9-gRNA Vorhersage-Algorithmen für <i>C. reinhardtii</i>	88
Abbildung 4.2: Einführung von Punktmutationen in einem Zwei-Schritt-Protokoll.....	94
Abbildung 4.3: Analyse der ChR2-Proteinmengen in den $\Delta chr1$ -Knockouts.....	100
Abbildung 4.4: Absorptionsspektren ausgewählter Photorezeptoren.....	102



Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für Genmanipulationen in eukaryotischen Zellen angewendete CRISPR/Cas-Effektoren	21
Tabelle 2: Geräte und ausgewähltes Verbrauchsmaterial	30
Tabelle 3: Chemikalien, Enzyme und Kits.	31
Tabelle 4: Genotypen der <i>E. coli</i> -Zelllinien	32
Tabelle 5: Selektive Medien zur Selektion von transformierten <i>C. reinhardtii</i> -Zellen.....	32
Tabelle 6: Algen-Nährstoffmedien	33
Tabelle 7: Verwendete <i>C. reinhardtii</i> Zelllinien.	34
Tabelle 8: Protokoll der Kolonie-PCR	36
Tabelle 9: Oligonukleotid-Klonierung zum Einbau neuer Zielsequenzen in die <i>aphVIII</i> -Kassette	37
Tabelle 10: Zielsequenzen der <i>aphVIII</i> -Testkassette (p182 pCrMC:EMX1-1:ChR1)	37
Tabelle 11: Verdau der ZF-Plasmide	38
Tabelle 12: Klonierung der ZFN-Plasmide	39
Tabelle 13: Zielsequenzen der <i>ChR1</i> -, <i>ChR2</i> - und <i>COP1/2</i> -ZFN-Plasmide	40
Tabelle 14: Plasmide zur Expression rekombinanter Cas-Nukleasen in <i>E. coli</i>	40
Tabelle 15: CRISPR-Onlinetools mit Unterstützung für <i>C. reinhardtii</i>	41
Tabelle 16: Herstellung doppelsträngiger DNA.....	43
Tabelle 17: FLAG-Sequenzen	43
Tabelle 18: Donor-Plasmide zur gezielten Integration von Reportergenen	43
Tabelle 19: Transformationsbedingungen mit ZFN-Plasmiden	46
Tabelle 20: Formation des Cas9-gRNA Komplex	47
Tabelle 21: Transformationsansatz zur Elektroporation	48
Tabelle 22: Transformationsbedingungen mit Cas9-RNPs.....	49
Tabelle 23: Elektroporationsbedingungen	51
Tabelle 24: Screening-PCR.....	52
Tabelle 25: Sequenzier-PCR	55
Tabelle 26: Verwendete Primer zum Screenen und Sequenzieren von Mutanten.....	55
Tabelle 27: Vergleich von RNP-Transformationsbedingungen in <i>C. reinhardtii</i>	92
Tabelle 28: Vergleich der Eigenschaften von ZFN, Cas9 und Cas12a.....	97
Tabelle 29: Gen-IDs der verwendeten <i>C. reinhardtii</i> -Gene	123
Tabelle 30: Liste der in dieser Arbeit generierten und verfügbaren Mutantenstämme	124
Tabelle 31: DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	126
Tabelle 32: Übersicht der verwendeten DNA-Plasmide.....	131
Tabelle 33: Zielsequenzen der verwendeten g RNAs.....	133



Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Greiner A.*, **Kelterborn S.***, Evers H., Kreimer G., Sizova I., & Hegemann P., 2017. Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell*. 29(10):2498–2518

* Geteilte Erstautorenschaft

Teile der Arbeit sind für die Veröffentlichung in einem Buchkapitel geplant:

Kelterborn S., Boehning F., Evers H., Sizova I., Baidukova O. & Hegemann P., Gene editing in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. In *Plant Synthetic Biology*, ed. M Zurbriggen. Springer US. *im Editoriat*

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf Konferenzen vorgestellt:

Kelterborn S., 2019. Gene-editing in green algae *C. reinhardtii*. *CRISPR/Cas9 workshop Japan*, Okayama & Kyoto, Japan, **Vortrag / Workshop**.

Kelterborn S., Sizova I., Baidukova O. & Hegemann P., 2019. A CRISPR/Cas9 Toolbox Enables Efficient Genome Editing and Opens *Chlamydomonas* for Synthetic Biology, *GCSB - German Conference on Synthetic Biology*, Aachen, Deutschland, **Poster**.

Kelterborn S., 2018. Genome Editing via CRISPR/Cas9 opens *Chlamydomonas reinhardtii* for Synthetic Biology, *GASB II Conference - Synthetic Biology made in Germany*, Berlin, Deutschland, **Vortrag**.

Kelterborn S., 2018. Genome editing in *Chlamydomonas reinhardtii*, *TRR175 Summer School - Plant Genome Editing*, Berlin, Deutschland, **Vortrag / Workshop**.

Kelterborn S., Sizova I., Baidukova O., Zschieschang E. & Hegemann P., 2018, A CRISPR/Cas9 Toolbox Enables Efficient Genome Editing and Opens *Chlamydomonas* for Synthetic Biology, *18th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas*, Washington, D.C., U.S.A., **Poster**.

Kelterborn S., 2017. A new CRISPR/Cas9 toolbox enables efficient gene editing in various *Chlamydomonas reinhardtii* strains, *AlgaeEurope*, Berlin, Deutschland, **Vortrag**.



Zusätzliche Tabellen

Tabelle 29: Gen-IDs der verwendeten <i>C. reinhardtii</i> -Gene	123
Tabelle 30: Liste der in dieser Arbeit generierten und verfügbaren Mutantenstämme	124
Tabelle 31: DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	126
Tabelle 32: Übersicht der verwendeten DNA-Plasmide	131
Tabelle 33: Zielsequenzen der verwendeten g RNAs.....	133

Tabelle 29: Gen-IDs der verwendeten *C. reinhardtii*-Gene

Gen-IDs sind von *Phytozome* (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#info?alias=Org_Creinhardtii) mit der *Chlamydomonas*-Genom-Annotierung in der Version 5.5 entnommen.

Genname	Gen-ID
<i>RBCS2</i>	Cre02.g120150
<i>HSP70A</i>	Cre08.g372100
<i>PSAD</i>	Cre05.g238332
<i>COP1/2</i>	Cre01.g002500
<i>ChR1 (COP3)</i>	Cre14.g611300
<i>ChR2 (COP4)</i>	Cre02.g085257
<i>HKR1 (COP5)</i>	Cre02.g074150
<i>HKR2 (COP6)</i>	Cre11.g467678
<i>HKR3 (COP7)</i>	Cre01.g038050
<i>HKR4 (COP8)</i>	Cre07.g329900
<i>HKR5/6 (COP9/10)</i>	Cre15.g643503
<i>aCRY</i>	Cre06.g278251
<i>pCRY</i>	Cre06.g295200
<i>PHOT</i>	Cre03.g199000
<i>UVR8</i>	Cre05.g230600
<i>ARG7</i>	Cre01.g021250
<i>RBP40</i>	Cre12.g483700
<i>PBCP</i>	Cre06.g257850
<i>PBCP-like</i>	Cre06.g256300
<i>SNRK2.2</i>	Cre12.g499500
<i>PSR1</i>	Cre12.g495100
<i>2-LOG</i>	Cre07.g340900
<i>4-IPT</i>	Cre17.g717350
<i>CAV2</i>	Cr16.g665050
<i>CiliK (GCLK1)</i>	Cre02.g104450

Tabelle 30: Liste der in dieser Arbeit generierten und verfügbaren Mutantenstämme

FLAG = Insertion der FLAG-Sequenz, FLAG+X = Insertion der FLAG-Sequenz mit zusätzlichen Sequenzabschnitten (z. B. Markerplasmid oder Verdoppelung des Donor-ODNs), Plasmid = Insertion des Markerplasmids, PH = interne Stammsammlung der AG Hegemann, CRC = *Chlamydomonas* Resource Center;

Zielgen/ Stammname	Stamm- hintergrund	Mutation	Resistenz	gRNA	PH- Nummer	CRC- Nummer
Teststamm „d“	CC-3403	/	Zc ^R	/	PH055	
COP1/2						
<i>Δcop1/2-f4</i>	CC-125	FLAG	Hyg ^R	r07	PH077	CC-5398
<i>Δcop1/2-f7</i>	CC-125	FLAG + X	Hyg ^R	r07	PH078	CC-5399
Chr1						
<i>Δchr1-e12</i>	CC-3403	Plasmid	Arg ⁺	r84	PH166	CC-5547
<i>Δchr1-f4</i>	CC-3403	Plasmid	Arg ⁺	r84	PH167	CC-5546
<i>Δchr1-h6</i>	SAG11-32b	FLAG	Pm ^R	r84	PH160	CC-5550
<i>Δchr1-f1</i>	SAG32-11b	Plasmid	Hyg ^R	r84	PH163	CC-5551
Chr2						
<i>Δchr2-d11</i>	CC-3403	2 x FLAG	Arg ⁺	r108	PH161	CC-5549
<i>Δchr2-f12</i>	CC-3403	Plasmid	Arg ⁺	r108	PH162	CC-5548
<i>Δchr2-h9</i>	SAG32-11b	FLAG	Pm ^R	r108	PH165	CC-5552
<i>Δchr2-h12</i>	SAG32-11b	Plasmid	Pm ^R	r108	PH164	
COP5 (HKR1)						
<i>Δcop5.20-b2</i>	CC-3403	FLAG + X	Arg ⁺	r09	PH042	CC-5437
<i>Δcop5.12-h3</i>	CC-3403	Plasmid	Arg ⁺	r10	PH043	CC-5438
<i>Δcop5-d11</i>	CC-125	FLAG	Hyg ^R	r09	PH065	CC-5443
<i>Δcop5-e6</i>	CC-125	2 x FLAG	Pm ^R	r09	PH103	CC-5448
COP6						
<i>Δcop6-f9</i>	CC-125	FLAG + Plasmid	Pm ^R	r97	PH143	CC-5431
<i>Δcop6-g4</i>	CC-125	Plasmid	Pm ^R	r97	PH142	CC-5432
COP8						
<i>Δcop8-e9d1</i>	CC-3403	FLAG	Arg ⁺	r87	PH101	CC-5425
<i>Δcop8-f1a1</i>	CC-3403	Plasmid	Arg ⁺	r87	PH102	CC-5426
COP11/12						
<i>Δcop11-b9-1</i>	CC-125	Plasmid	Hyg ^R	r88	PH133	CC-5427
<i>Δcop11-b9-2</i>	CC-125	Plasmid	Hyg ^R	r88	PH134	CC-5428
aCRY						
<i>Δacry-a3</i>	SAG73.72	FLAG + X	Pm ^R	r19	PH073	
<i>Δacry-e10</i>	SAG73.72	Plasmid	Pm ^R	r19	PH074	
PHOT						
<i>Δphot-c4-1</i>	CC-125	FLAG	Hyg ^R	r60	PH013	CC-5391
<i>Δphot-b5</i>	CC-125	FLAG	Hyg ^R	r60	PH015	CC-5392
<i>Δphot-a5</i>	SAG11-32b	FLAG + X	Pm ^R	r24	PH135	CC-5429
<i>Δphot-a7</i>	SAG11-32b	Plasmid	Pm ^R	r24	PH136	CC-5430
UVR8						
<i>Δuwr8-i7-e12</i>	CC-3403	FLAG + X	Arg ⁺	r15	PH048	CC-5439
<i>Δuwr8-i8-e4</i>	CC-3403	FLAG	Arg ⁺	r14	PH050	CC-5440
<i>Δuwr8-a2</i>	CC-125	FLAG	Pm ^R	r14	PH125	CC-5441
<i>Δuwr8-f3</i>	CC-125	FLAG + X	Pm ^R	r14	PH126	CC-5442
PHOT/UVR8						
<i>Δphot Δuwr8-b3</i>	PH015 (CC-125)	FLAG / FLAG	Hyg ^R , Pm ^R	r60, r14	PH130	CC-5446
<i>Δphot Δuwr8-h9</i>	PH015 (CC-125)	FLAG / FLAG	Hyg ^R , Pm ^R	r60, r14	PH131	CC-5447
<i>Δuwr8-Δphot-d5</i>	PH050 (CC-3403)	FLAG / FLAG + X	Arg ⁺ , Pm ^R	r14, r24	PH067	CC-5444
<i>Δuwr8-Δphot-f6</i>	PH050 (CC-3403)	FLAG / Plasmid	Arg ⁺ , Pm ^R	r14, r24	PH068	CC-5445
RBP40						
<i>Δrbp40-b3</i>	CC-3403	FLAG	Arg ⁺	r90	PH107	

Zielgen/ Stammname	Stamm- hintergrund	Mutation	Resistenz	gRNA	PH- Nummer	CRC- Nummer
<i>Δrbp40-e6</i>	CC-3403	FLAG	Arg+	r90	PH109	
<i>Δrbp40-a6</i>	CC-4533	FLAG	Pm ^R	r90	PH113	
<i>Δrbp40-d1</i>	CC-4533	FLAG	Pm ^R	r90	PH121	
SNRK2.2						
<i>Δsnrk2.2-e2</i>	CC-125	FLAG	Hyg ^R	r32	PH076	
<i>Δsnrk2.2-c5</i>	SAG11-32b	FLAG	Pm ^R	r32	PH158	
PSR1						
<i>Δpsr1-d10</i>	CC-3403	FLAG	Arg+	r67	PH011	CC-5424
2-LOG						
<i>Δ2-log-a12</i>	CC-125		Pm ^R	r101	PH146	CC-5449
<i>Δ2-log-c9</i>	CC-125		Pm ^R	r100	PH147	CC-5450
4-IPT						
<i>Δ4-ipt-f6</i>	CC-125	Plasmid	Pm ^R	r162	PH219	CC-5540
<i>Δ4-ipt-a10</i>	CC-125	plasmid	Pm ^R	r162	PH220	CC-5541
CAV2						
<i>Δcav2-b12</i>	CC-125	Plasmid	Pm ^R	r144	PH168	CC-5544
<i>Δcav2-a11</i>	CC-125	Plasmid	Pm ^R	r144	PH169	CC-5545
CiliK / GCLK1						
<i>Δcilik-d1</i>	SAG11-32b	Plasmid	Pm ^R	r138	PH170	CC-5543
<i>Δcilik-d2</i>	SAG11-32b	Plasmid	Pm ^R	r138	PH171	CC-5542

Tabelle 31: DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

* = PTO(Thiophosphorsäureester)-Schutzbindung; ^P = PAGE aufgereinigt. FLAG-Sequenzen sind unterstrichen.

Nummer	Name	Sequenz
Donor-ODNs		
1190	ChR2-FLAG 90	TACATCGAGGGTTACCACACCGTGCCGAAACT <u>TATAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGGGCCGGTGTGCCAGGTGGTGACTGGCA</u>
1191	ChR2-FLAG 90 RC	TGCCAGTACCACCTGGCGACACCGGCCCGTCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCCTTATAGTTTTCGGCACGGTGTGGTAACCCTCGATGTA
1192	ChR2-FLAG 90	T*A*CATCGAGGGTTACCACACCGTGCCGAAACT <u>TATAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGGGCCGGTGTGCCAGGTGGTGACTGG*</u> C*A
1193	ChR2-FLAG 90 RC	T*G*CCAGTACCACCTGGCGACACCGGCCCGTCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCCTTATAGTTTTCGGCACGGTGTGGTAACCCTCGATG* *A
1206	COP2.1-HA 90	C*A*GCGTCTTCTTGAGACGTCATACTCGCCTTAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAGCTGATGCTCTTGAAGTCCATTGTTGCG*T*G
1207	COP2.1-HA 90 RC	C*A*CGCAACAATGGACTTCAAGAGCATCAGCT <u>ACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCTAAGGCGAGTATGACGTCTCCAAGAAGACGC*T*G</u>
1214	UVR8.1-FLAG 90	C*G*G*TCGCGTCGTACGAGGACAGATCTACAT <u>TATAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACCTGGGCTGGTGGTGGCGTTGGGGCC*C*A*G</u>
1215	UVR8.1-FLAG 90 RC	C*T*G*CGCCCCAACGCCACCCACGCCCCAGGTCCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCCTTATATGTAGATCTGTCCTCGTGACGACGCCA*C*C*G
1216	UVR8.2-FLAG 90	T*G*G*TGCGCCTGGACGGCGTCACAGTGACGAT <u>TATAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGTCGTGGTATGCGGCTGGCGGCACAGTG*C*C*G</u>
1217	UVR8.2-FLAG 90 RC	C*G*G*CACTGTGCCGCCAGCCGATACCACACGTCCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCCTTATATCGTCACTGTGACGCCGTCACAGGCCA*C*C*A
1247	RBP40.1-FLAG 90	G*A*C*GTGCCCTGGTGCCATGCGCCGCCCaCT <u>TATAAGGACCACGACATCGACTCAAGGACGCGTGGCGATGGCCCCGTTTCGTCTGG*C*T*C</u>
1248	RBP40.1-FLAG 90 RC	G*A*G*CCAGACGAACAGGGCCATCGCCACGGTCCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCCTTATAGtGGGGCGGCGCATGGCACCAGGGCAC*G*T*C
1249	RBP40.3-FLAG 90	A*G*C*GTGACAGCGAGAGTGGGGACGcGa <u>ACTATAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACCGCGGCCGCGGCGAGCGCCGACGGG*A*C*C</u>
1250	RBP40.3-FLAG 90 RC	G*G*T*CCGCTGCGGCGCTCGCCGCGGCCCGGTCCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCCTTATAGTtCgCGTCCCCACTCTCGCTGTAC*G*C*T
1302	aCry.1-FLAG 90	G*A*G*TGGGGCGTGACACAGCTGTGTTTTGAGCT <u>TATAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGGAGCCGTACGCCAAGGTCCGCGACG*C*C*G</u>
1303	aCry.1-FLAG RC 90	C*G*G*CGTCGCGACCTTGGCGTACGGCTCCGTCCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCCTTATAGTCAAAACACAGCTGTGTACGCCCCA*C*T*C
1313 ^P	APH 60 rv	G*G*T*GACCGGGTGTATCGACGTGGGGCGGGTCGGCCGTGCCGACCGGCACTCCGATCT*C*G*C
1314 ^P	APH 60 fw RC	G*C*G*AGATCGGAGTGCCGGTCCGACGGCCGACCCGCCCCAGTCGATCAGCCGGTC*A*C*C
1320 ^P	COP2.1-HA 90 rv	C*A*GCGTCTTCTTGAGACGTCATACTCGCCTTAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAGCTGATGCTCTTGAAGTCCATTGTTGCG*T*G
1321 ^P	COP2.1-HA 90 fw RC	C*A*CGCAACAATGGACTTCAAGAGCATCAGCT <u>ACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCTAAGGCGAGTATGACGTCTCCAAGAAGACGC*T*G</u>
1322 ^P	COP2.1-HA asym fw	T*A*CCCCTACGACGTGCCGACTACGCCTAAGGCGAGTATGACGTCTCCAAGAA GACGCTGA*A*G
1323 ^P	COP2.1-HA asym RC	T*T*AGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGTAGCTGATGCTCTTGAAGTCCATTG TTGCGTGC*A*G
1343	COP2.12-HA 90 FW	T*T*CTGCACGAACAATGGACTTCAAGAGCATT <u>ACCCCTACGACGTGCCCGACTACGTAACAGCGGCGAGTATGACGTCTCCAAGAAGA*C*G</u>
1344	COP2.12-HA 90 RV	C*G*TCTTCTTGAGACGTCATACTCGCCGCTGTTACGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGTAATGCTCTTGAAGTCCATTGTTGCGTGCAG*A*A

Nummer	Name	Sequenz
1397	PBCP-LIKE.3-HA 90	<u>G*T*GGCCAAAGGCGGGAGGACTGGTACTTCaTACCCTACGACGTGCCCGACT</u> <u>ACGTAATCGCGGCCAACCCACCGCAGTGGGGT*G*G</u>
1398	PBCP-LIKE.3-HA 90-RC	C*C*ACCCCACTGCGCGGTGGTGGCCGCGATTACGTAGTCGGGCACGTCGTAGG GGTAaTGAAGTACCAGTCTCGCCGCTTTGGCC*A*C
1472	ssCOP5N12-PhoTfw	<u>C*A*A*TCACACTGCAGGTGACTCGGTGATGCTATAAGGACCACGACATCGACT</u> <u>ACAAGGACTGGCGGACGTGCTGATGATCACATTCC*G*C*A</u>
1473	ssCOP5N12-PhoTrev	T*G*C*CGAATGTGATCATCAGCACGTCCGCCAGTCTTGTAGTCGATGTCGTGGT CCTTATAGCATCACCGAGTACACCTGCAGTGTGA*T*T*G
1474	ssCOP5N20-PhoTfw	<u>T*A*G*CTGAGGCGCGGCACGACAGCAGCCGCTATAAGGACCACGACATCGACT</u> <u>ACAAGGACCAGTCTGGAGGTGCTGCGCCTGTTCCG*A*G*T</u>
1475	ssCOP5N20-PhoTrev	A*C*T*GCGAACAGCGCAGCACCTCCAGACTGGTCCTTGTAGTCGATGTCGTGG TCCTTATAGCGGCTGCTGTCGTGCCGCGCCTCAG*C*T*A
1476	HDR SNRK22.1-CAPF RC	A*G*C*CGGGTCCAGCAGGCCAGACGCCCTGACTCCGTGTAACTTTTCCTT CAATCgAAATTGGACATCCTCGCTATGAAtAGGT*T*G*G
1477	HDR SNRK22.1-CAPF FW	<u>C*C*A*ACCTgTTCATAGCGAGGATGTCCAATTTcGATTGAAGGAAAAGTTACAA</u> <u>CGGAGTCAGGGGCTCTGGTCCGCTGCTGGACCCG*G*C*T</u>
1490	HDR PBCP.21-HA 90 FW	A*C*CGTGGGCTGGCTGGTCTTTTCATAGCTTACGTAGTCGGGCACGTCGTAG GGTAtCGGTGGAGGTGCCTGCAACGCGCCATCCT*C*A
1491	HDR PBCP.21-HA 90 RC	<u>T*G*AGGATGGCGGTTGCAGGCACCTCCACCGaTACCCTACGACGTGCCCGACT</u> <u>ACGTAAGCTCATAGAAAAGACCAGCCAGCCACG*C*G*T</u>
1492	HDR PBCP.31-HA 90 FW	<u>T*A*CGGGGGCGGCATGATGGGCGTGGCCGATGGTACCCTACGACGTGCCCGAC</u> <u>TACGTAAGTTGGCGGTGGCAGGAGTCTGGCGTGA*A*C</u>
1493	HDR PBCP.31-HA 90 RC	G*T*TCACGCCAGACTCCTGCCACCCGCCAACTTACGTAGTCGGGCACGTCGTAGG GGTACCATCGGCCACGCCATCATGCCGCCCCG*T*A
1501	snrk22.2-CAPF RC 90	T*G*GTGAAGATATGTGATTTTGGGTACTCCACTCCGTTGTAACTTT TCCTTCAATcAAATGTTGGGTGGGCAGCCGCAtACGGCGTCA*G*G
1502	snrk22.2-CAPF FW 90	<u>C*C*TGACGCCGTgTGCGGCTGCCACCCAACATTTgGATTGAAGGA</u> <u>AAAGTTACAACGGAGTGGAGTACCCAAAATCACATATCTTAC*C*A</u>
1559	HDR PSR1.1-CAPF PAM	<u>C*G*GCATGCCGCATCTACTAGCACCGAGCGTTtcGATTGAAGGAAAAGTTACA</u> <u>ACGGAGTGGCACGGCGTCCCCGGCACTGGGCACA*C*C</u>
1560	HDR PSR1.1-CAPF noPAM	G*G*TGTGCCAGTCCGGGCGAGCGCGTGCCTCCGTTGTAACTTTTCCTTCAA TCgaAAACGCTCGGTGCTAGTAGATGCCGCATGC*C*G
1613	HDR ARG7 noPAM 60	G*C*T*ACGTGCAGTGCAGCGACGCGtACGCGcACCGGCTCCTCGCTCATGCCGAG AAGA*A*G*A
1614	HDR ARG7 PAM 60	T*C*T*CTTCTGCGGCATGAGCGAGGAGCCGgtcGCGTAcGCGTCGCTGCACTGC ACGT*A*G*C
1717	FLAG only	<u>CGAAACTATAAGGACCACGACATCGACTACAAGGAC</u>
1718	FLAG only RC	<u>GTCCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCTTATAGTTTCG</u>
1719	HDR RBP40.12-FLAG noPAM	<u>C*G*A*ATTGGGAGCAACTCCGTCACCCCGAATAAGGACCACGACATCGACT</u> <u>ACAAGGACCGAGTGGTGAAGCAAGCGATTTTGGC*T*G*A</u>
1720	HDR RBP40.12-FLAG PAM	T*C*A*GCCAAAATCGCTTGTGCTCACCCTCGTCTTGTAGTCGATGTCGTGGT CCTTATTCGGGTTGGACCGGAGTTGCTCCCAAT*T*C*G
1721	HDR RBP40.32-FLAG noPAM	<u>C*A*A*CTGGGAGGCCCTGCGCTCCAACCCCGAATAAGGACCACGACATCGA</u> <u>CTACAAGGACGAGTGGTGGGTGTTAGGCGGGGCTT*G*G*G</u>
1722	HDR RBP40.32-FLAG PAM	C*C*C*AAGCCCCCCTAACACCCCACTCGTCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCC TTATAGTTCGGGTTGGAGCGCAGGGCTCCCAAG*T*T*G
1796	FLAG v2 (CAPF-STOP)	<u>C*T*A*ATTAGCTAACTCCGTTGTAACTTTTCCTTCAATCGAAAATAATTAGC*T*</u> <u>A*A</u>
1797	FLAG v2 RC (CAPF-STOP)	<u>T*T*A*GCTAATTAGTTTCGATTGAAGGAAAAGTTACAACGGAGTTAGCTAAT*T</u> <u>*A*G</u>
1939	COP2.1rev FLAG v2	<u>TTAGCTAAGACTACGAGAACTTCAGGTAcggtCTAG</u>
1940	COP2.1rev FLAG v2 RC	<u>CTAGACCGTACCTGAAGTTCTCGTAGTCTTAGCTAA</u>
1945	EMX1-1 FLAG v2	<u>TTAGCTAAGCCTCCCCAAAGCCTGGCCAGGGtCTAG</u>

Nummer	Name	Sequenz
1946	EMX1-1 FLAG v2 RC	<u>CTAGACCCTGGCCAGGCTTTGGGGAGGCTTAGCTAA</u>
1974	STOP-pure FLAG v2	<u>TTAGACTCTAACTAGATCAGcgg</u>
1975	STOP-pure FLAGv2 RC	<u>CCGCTGATCTAGTTAGAGTCTAA</u>
1998	Zif268 FLAG v2	<u>TAGCTAACGCCACGCGAATTCGCGTGGGCGTCTAG</u>
1999	Zif268 FLAG v2 RC	<u>CTAGACGCCACGCGAATTCGCGTGGGCGTTAGCTAA</u>
2254	HDR 4-IPT.4-HA FW	A*C*C*GGGGCCATCCAGGCCATGTCTGACTACCCTTACGACGTCCCGGATTACGC TGGTAGCcCTGCGGCCCGCGCGCGGCCGCC*C*C*C
2255	HDR 4-IPT.4-HA RV	G*G*C*GGCGGCCCGCCCGCGGGCCGAGgGCTACCAGCGTAATCCGGGACGT CGTAAGGGTAGTCAGACATGGCCTGGATGGCCCC*G*G*T

PCR-Primer

1050	SK_1043 Ble-Starfw	GCCAAGCTGACCAGCGCCGTTCCGGTGCTCAC
1051	SK_1044 3'Psa-467rev	TCTCACATGGCCTGGCCATTACATGCAGTATGGCAT
1131	COP2.2 binding site Fw	GCGGaCCTGGTGCCAAGCCAGGCATTGAGGTGAGTACAAG
1133	COP2.3 binding site Fw	GCGGACTTCAGCATCGAGAAGAAGTTCAAGCTGAGGGC
1134	COP2.3 binding site Rv	AGGGGCCCTCAGCTTGAACCTTCTTCTCGATGCTGAAGT
1136	COP2.4 binding site Rv	AGGGtcCCACGAGAACTTCCTGCCCTTGACAATGTGCGA
1143	HA-tag2 seq rev	TTAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAG
1144	HA-tag2 seq rev2	TAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTA
1148	COP2.3-459 left fw +XhoI	ATGCTCGAGAACTCGCATCCCCTTACTACTCG
1153	COP2.4+80 left fw +XhoI	AAAACCTCGAGGGGCTGCTCCTCCTGTCATAA
1157	COP2.4-316 fw	GTCAAGACCAGGCGGTAATAGT
1159	CHR2-3468rev	GCGGTTGACACTCAGCACTCATTCCGC
1161	CHR2-2367fw	GCTGGTCCAACAATTGGGCGCTGGGC
1163	FLAG-1STOPfw	CGAAACTATAAGGACCACGACATCGACTACAAGGAC
1166	ChR1-5736rev	CTCCTGCACACCGTTTCGTACCTTGCTGCTGTA
1168	ChR-4412fw	CTTTTCTTGGAACCTGTTGCGAACCTGCATGTCA
1169	ChR1- Kpnrev 2234-2263	GAGGTACCGACTGGCCTGAGCTGTGTTGCG
1170	ChR1-4626fw	CATGCAGCCCATGCAGCAGGCTATG
1197	COP2+125 rev	GCGCTTGACCACCTGATTACC
1199	COP2+631 rev	GCTTTGTGGGAGGGGCTTTATTTCG
1202	COP2+1140 rev	CCCCCTGTGTGTTTCGCCCTTTCAT
1218	FLAG 30 bp fw	TATAAGGACCACGACATCGACTACAAGGAC
1219	FLAG 30 bp rev	GTCCTTGTAGTCGATGTCGTGGTCCTTATA
1221	UVR8+268 fw	ATGGGGTCGAGGTGAAGATGGCCAG
1224	UVR8+1999 fw	TCATCCCCCTCCCCTCCAACCTCCAC
1225	UVR8+2473 rev	GGCGGGCGAAGTGGAGAGTGGCGAC
1226	UVR8+854 rev	CGGAGAAGAACGCAATGGGACGCGG
1231	HA-tag2 seq fw3	TACCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTAA
1236	RBP40+116 rv	TTGCTCCACATCACCCGACCTCC
1237	RBP40+530 rv	GAAGAGGTGAGGGCGGATGCAGGGA
1240	RBP40-47 fw	GAGCTCGACTGCCTCCTTACGTATC
1242	RBP40+775 fw	CTCACCACCCATTTATCTCACCACC
1246	RBP40+1348 rv	AGCTGCAACCTTTACTCCACATCG
1253	Phot+892 rev	GGTGGTTCGTGGTGCTTGAATG
1255	Phot+470 rev	AAGCCTCAAAGCCCCTAATCTCCC

Nummer	Name	Sequenz
1256	Phot+347 fw	GCACTAAGTGAAGGCCGGGGTCGC
1257	Phot-210 fw	GGCACTGAGATGGACGCGTATT
1275	COP5-1108fw	TTGATTCACCTTGCCCCCTACTATTGGCTCTC
1276	COP5-1286rev	CCTCTCAACCCGACACCTCCGC
1300	COP5-276fw	CGAGCGCGAGAGCGCCAAGTTTC
1301	COP5-2272rev	GCGGACCACTTGGCCCCAGAAA
1308	aCRY+1060fw	GCCGCCGCCACAGTTTCCAGGCTCG
1309	aCRY+1132fw	GGGTGTTCCGGGAGTGGGGCGTGA
1312	aCRY+1251rv	ATACAGTGTGTGGCTTATGGGAGTC
1360	COP 2 Exon 9 620 bp FW	CGGGCTCGATGTGTCTAGTG
1400	PBCP-255 fw	GTCAGTCAACAACCCCTCTCCCTC
1402	PBCP+168 fw	CTCATAGAAAAGACCAGCCAGCCCA
1403	PBCP+279 rv	CCGGGTGCGGAAGATAACAAA
1406	PBCP+314 fw	TAGACCTTGCCCTCGCACTAGGCGG
1407	PBCP+962 rv	CCAAGACAAGCAAGGGAGAGTGC
1408	PBCP+828 rv	CCGGCACCGGGGAGAGAACACCGAA
1410	PBCP-LIKE+40 fw	CATCTGGACGGCAAAGCAGCGTGTT
1412	PBCP-LIKE+435 fw	GATGGCAGCGTCATACACGGAAGAG
1414	PBCP-LIKE+592 rv	CTTCCAGCCCGATGGCCCAGTCAAC
1416	PBCP-LIKE+1026 rv	AAGGAAAGGGCGATGGTTGGCAAGG
1417	PBCP-LIKE+1044 fw	TTTCCTTGCTTACCCGGCGCTCCTC
1418	PBCP-LIKE+1133 fw	TGCTGGCGTCGGGTGCGTTCGTGCT
1419	PBCP-LIKE+1355 rv	CTGGGCGGGAAATAAGACTAAATGG
1420	PBCP-LIKE+1266 rv	TGGCAATGCGAAGCGGCCGGCGGAC
1497	snrk2.2-521 fw	TCCGGAACCAACACACCTGCCT
1500	snrk2.2+430 rv	GTTACCCATCCCCAACCCCGAACC
1593	PSR1-31 FW	TCGCCATTTAGTAGACCTGCCCTGG
1595	PSR1+373 FW	TCCTCAGAGTACATGCTGGCCCCG
1596	PSR1+469 RV	TGCCCCCATGGACAGTCCGCGAA
1601	PSR1+937 RV	GCGACTTGATGTGGTAGATGGTGAG
1607	COP2SNAPmVenusrv	CGACTAGGGCCAATCGGCGTG
1608	COP4.19SNAPmVenusfw	CGGCATGAACAACATGGGCGGC
1609	COP4.19SNAPmVenusrv	CCCCAACAGAAGCCACAGATGAAGCT
1610	CAPF-RV1	ATTTGATTGAAGGAAAAGTTACAACGGAG
1619	Arg7+3831 FW	ACACTCCCCCTGTGCTCCTCAACA
1621	Arg7+4239 RV	CCACCCAAACCCACACACTACAACG
1666	SNRK2.2+1164 FW	GAATGCCATTGGCTCGCCCT
1667	SNRK2.2+2023 RV	TACAATCGGGCGATGGGCACG
1669	SNAP fw screen	TCGGCTGGGTAAGCCTGGTC
1671	mVenus fw screen	GGACACCCTCGTCAACCGGA
1677	ChR1+1194_FW	GTTACGCCCACAGGAGTTT
1680	ChR1+1031_FW	CCACCGACCCCAATACACTCA
1682	ChR1- 1352 RC	GCGCGAATCGCGCCAGGCTACACAG
1684	ChR1- 1452 RC	CCAGAGCGGTGACGAGGACG

Nummer	Name	Sequenz
1713	SNRK2.2-29 Fw	TGGCTGCCAGACCCCAAAAGC
1716	SNRK2.2+116 Rv	GGGCGAGGACAGCACCTCTATG
1723	COP2SNAP locus rvA	TCAGCTCCCAGTTCAGGGCT
1753	SNRK2.2+1545 Fw HRM	GGTGAACCGCGACATCAAGC
1754	SNRK2.2+1695 Rv HRM	GAACCGGTTAGCCTGGTGGT
1759	COP7+205 Fw HRM	ACTGTGCAGTCTTGGGAGCCT
1760	COP7+359 Rv HRM	TCGCGCTGCTCGTGATTGTAT
1765	COP8+477 Fw	CAGCATGATGCACGCGCAAA
1766	COP8+1222 Rv	CCATGAGACATGGCGGTCAGC
1769	COP8+677 Fw HRM	CTCTTTCCGCAACTGAGGCG
1770	COP8+855 Rv HRM	GGCCAGTCACTTACAGGCAGC
1773	COP11+429 Fw	TGCTTCTGCCGGCGTTCATC
1774	COP11+1150 Rv	TGGTTAGGCCAGGTGTCCC
1775	COP11+710 Fw HRM	CCACCACAGGGATGGCTTCA
1776	COP11+889 Rv HRM	ACGGTTGTTGGCAGCACAT
1783	CAPF only FW	CTCCGTTGTAACCTTTTCCTTCAATCGAAA
1867	COP6+116 FW	GGTGTCAATATTTGGTGCAGCCG
1869	COP6+594 FW	GGTCGAGGTAGATGGGCCTTTTG
1871	COP6+796 RV	CAACACACCACCCACCTTGATG
1872	COP6+1000 RV	AGCATGTGGGTCAAGCAAAGACA
1897	2-LOG-438 FW	AGGGCAGGCTGCAAATCTCG
1900	2-LOG+34 FW	GTCTTACCGGTTCTCGCCCG
1902	2-LOG+246 RV	CTTCTTGAGCTCGCGAGGGG
1903	2-LOG+667 RV	AAACGTTGAGGCACAGGCGA
1917	4-IPT+355 RV	CTATCTCGTCACACTCGCAACCC
1939	COP2.1rev (FLAGv3 insert)	TTAGCTAAGACTACGAGAACTTCAGGTAcggtCTAG
1945	EMX1-1 (FLAGv3 insert)	TTAGCTAAGCCTCCCCAAAGCCTGGCCAGGGtCTAG
1953	Ch R2-E123 165 bp RC	AGGAAGTAGTTGGCCGTCAG
2002	Ch R2 (E123)+1204 fw	TTACCGGAAACAGGCCACCG
2004	Ch R2 (E123)+940 fw	CTGGACCCGAACGCAGATGG
2005	Ch R2 (E123)-1542 rv	ATGGTGCGCCTGCTGTAGTC
2022	Cilik_sl1_FW	CAACGCCAGGAGCAGCGAGAT
2023	Cilik_sl1_RE	CAAAGGCGAGAAAGTCACGACCC
2028	Cilik_II2_FW	GTCATGGTCGCGACTCGTGTTAT
2029	Cilik_II2_RE	ATTCAGGCGTATGTTGGAGGTGG
2032	CAV2_SL_FW_2	GGCATGTGCTTGTCTTTACACC
2033	CAV2_SL_RV_2	TGGACCTGGTGACCAACGTAGT
2036	CAV2_LL_FW_2	CGTTACGTTGCGGTAAAAGGTGC
2037	CAV2_LL_RV_2	GTAGAAACACGGGCGCAACAAAG
2214	4-IPT.3+102 FW	TCGGCGCAAGCCCATGGTG
2217	4-IPT.3-66 FW	GCATCTACTGCAGCCTCTACAACC
2218	4-IPT.3+434 RV	GTGTGCGATCGGTTCCGATACTT

Tabelle 32: Übersicht der verwendeten DNA-Plasmide

CRC = Chlamydomonas Resource Center. Plasmidkarten sind in unter www.chlamy.de/diss/plasmids zu finden.

Name	Nummer	Verwendung	Referenz
Selektionskassetten			
pBLE (pMS188)	p068	BLE-Resistenzkassette gegen das Antibiotikum Zeocin zur Selektion von <i>C. reinhardtii</i> Transformanten.	Schroda et al. 2002
pAPHVIII	p075	APHVIII-Resistenzkassette gegen das Antibiotikum Paromomycin zur Selektion von <i>C. reinhardtii</i> Transformanten.	Greiner et al. 2017
pARG7 (pHR11)	p230	ARG7-Kassette zur Komplementation von Arginin-Auxotrophen <i>C. reinhardtii</i> -Stämmen.	Hussam Hassan Nour-Eldin (CRC)
pAPHVII	p360	APHVII-Resistenzkassette gegen das Antibiotikum Hygromycin B zur Selektion von <i>C. reinhardtii</i> Transformanten.	Greiner et al. 2017
aphVIII*-Reparatur			
pCrMC:EMX1.1:ChR1	p182	aphVIII-Reparaturkassette mit EMX1-1 und ChR1 Insert	Greiner et al. 2017
pHD-aphVIII ^{Δ120}	p183	HDR Donor-Plasmid zur aphVIII*-Reparatur	Sizova et al. 2013
pCrMCv2	p280	Klonierungsplasmid der aphVIII*-Reparaturkassette	diese Arbeit
ZFN-Plasmide			
pCr2-ZFN-L cloning	p274	Expressionskassette für ZFNs. Klonierungsplasmid für neue ZF-Bindedomänen. P _{HSP70} -Intron _{RBCS2} [Esp3I-Spacer]-FokI ("Sharkey links")	diese Arbeit
pCr2-ZFN-R cloning	p275	Expressionskassette für ZFNs. Klonierungsplasmid für neue ZF-Bindedomänen. P _{HSP70} -Intron _{RBCS2} [Esp3I-Spacer]-FokI ("Sharkey rechts")	diese Arbeit
pCr3-ZFN:ChR1-L	p216	Expressionskassette für ChR1-ZFN-L	Sizova et al. 2013
pCr3-ZFN:ChR1-R	p217	Expressionskassette für ChR1-ZFN-R	Sizova et al. 2013
pCr3-ZFN:ChR2-L	p218	Expressionskassette für ChR2-ZFN-L	Greiner et al. 2017
pCr3-ZFN:ChR2-R	p219	Expressionskassette für ChR2-ZFN-R	Greiner et al. 2017
pCr3-ZFN:COP2.1-L	p314	Expressionskassette für COP2.1-ZFN-L	diese Arbeit
pCr3-ZFN:COP2.1-R	p315	Expressionskassette für COP2.1-ZFN-R	diese Arbeit
pCr3-ZFN:COP2.2-L	p316	Expressionskassette für COP2.1-ZFN-L	diese Arbeit
pCr3-ZFN:COP2.2-R	p317	Expressionskassette für COP2.1-ZFN-R	diese Arbeit
pCr3-ZFN:COP2.3-L	p318	Expressionskassette für COP2.1-ZFN-L	diese Arbeit
pCr3-ZFN:COP2.3-R	p319	Expressionskassette für COP2.1-ZFN-R	diese Arbeit
HDR Donor-Plasmide			
pHD-COP2.9-SNAP	p368	HDR Donor-Plasmid für COP2.9 mit SNAP-Tag	Zschieschang 2018
pHD-COP2.9-mVenus	p369	HDR Donor-Plasmid für COP2.9 mit mVenus	Zschieschang 2018
pHD-COP4.19-SNAP	p370	HDR Donor-Plasmid für COP4.19 mit SNAP-Tag	Zschieschang 2018

Name	Nummer	Verwendung	Referenz
pHD-APHVIII ^{Δ120} -ChR1-FLAG	p005	Tandem HDR Donor-Plasmid zur <i>aphVIII</i> -Reparatur und <i>ChR1</i> -FLAG Integration mit 2600 bp homologen Bereichen	<i>Sizova et al. 2013</i>
pHD-ChR2-FLAG	p282	HDR Donor-Plasmid zur <i>ChR2</i> -FLAG Integration mit 2800 bp homologen Bereichen	<i>Greiner et al. 2017</i>
pHD-ChR2-FLAG 500	p313	HDR Donor-Plasmid zur <i>ChR2</i> -FLAG Integration mit 500 bp homologen Bereichen	<i>diese Arbeit</i>
pHD-COP2.1-FLAG	p309	HDR Donor-Plasmid zur <i>COP1/2-#1</i> -FLAG Integration mit 500 bp homologen Bereichen	<i>diese Arbeit</i>
pHD-COP2.2-FLAG	p310	HDR Donor-Plasmid zur <i>COP1/2-#2</i> -FLAG Integration mit 500 bp homologen Bereichen	<i>diese Arbeit</i>
pHD-COP2.4-FLAG	p312	HDR Donor-Plasmid zur <i>COP1/2-#3</i> -FLAG Integration mit 500 bp homologen Bereichen	<i>diese Arbeit</i>

Cas-Protein Expression

pET-28b-Cas9-His	p197	Expression von <i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9 in <i>E. coli</i> zur Aufreinigung über einen His-Tag	Alex Schier (addgene #47327) <i>Gagnon et al. 2014</i>
BPK2101 SaCas9	p198	Expression von <i>Staphylococcus aureus</i> Cas9 in <i>E. coli</i> zur Aufreinigung über einen FLAG-Tag	Keith Joung (Addgene # 65770) <i>Kleinstiver et al. 2015</i>
pET-28b-SaCas9-His	p268	Expression von <i>Staphylococcus aureus</i> Cas9 in <i>E. coli</i> zur Aufreinigung über einen His-Tag	<i>diese Arbeit</i>
pDEST-hisMBP-AsCpf1	p356	Expression von <i>Acidaminococcus sp.</i> Cas12a (Cpf1) in <i>E. coli</i> zur Aufreinigung über einen His-Tag	<i>Jin-Soo Kim (Addgene #79007)</i> <i>Hur et al. 2016</i>
pMAL-his-LbCpf1	p372	Expression von <i>Lachnospiraceae bac.</i> Cas12a (Cpf1) in <i>E. coli</i> zur Aufreinigung über einen His-Tag	<i>Jin-Soo Kim (Addgene # 79008)</i> <i>Hur et al. 2016</i>

Tabelle 33: Zielsequenzen der verwendeten g RNAs

PAM = *protospacer adjacent motif*, GTS = *aphVIII**-Testkassette; N = RNA-komplementär zur Zielsequenz, * = PTO-Schutzbindung, X = 2'-O-Methylierungen

Nummer	Name/ Zielgen	Zielsequenz	PAM
Zielsequenzen der SpCas9-gRNAs			
r007	COP2.1 (<i>COP1/2-a</i>)	ATGGACTTCAAGAGCATCAG	CGG
r009	COP5-N20 (<i>COP5-a</i>)	GCAGCACCTCCAGACTGACG	CGG
r010	COP5-N12 (<i>COP5-b</i>)	GGTGTACTCGGTGATGCTGG	CGG
r011	EMX1-1 (GTS)	GCCTCCCCAAAGCCTGGCCA	GGG
r014	UVR8.2 (<i>UVR8-a</i>)	CGGCGTCACAGTGACGAGTG	TGG
r015	UVR8.1 (<i>UVR8-b</i>)	CGAGGACAGATCTACAGCTG	GGG
r017	RBP40.1 (<i>RBP40-a</i>)	AGGGGCCATCGCCACGCGCG	GGG
r018	RBP40.3 (<i>RBP40-b</i>)	GAGAGTGGGGACGAGCGCGG	CGG
r019	aCRY.1 (<i>aCRY</i>)	GCTGTGTTTTGAGCACGACA	CGG
r024	Phot.2 (<i>PHOT</i>)	GACTGGATATGGACCCGATG	AGG
r032	SNRK22.1 (<i>SNRK2.2-a</i>)	TAGCGAGGATGTCCAATCAG	GGG
r034	SNRK22.2 (<i>SNRK2.2-b</i>)	GCTGCCACCCAACAGACCT	TGG
r044	PBCP-LIKE.2 (<i>PBCP-LIKE-a</i>)	CGACGCAACTACCAGCTGAG	GGG
r045	PBCP-LIKE.3 (<i>PBCP-LIKE-b</i>)	CGAGGACTGGTACTTCATCG	CGG
r054	PBCP.21 (<i>PBCP-a</i>)	GGTCTTTTCTATGAGCTCGG	TGG
r055	PBCP.31 (<i>PBCP-b</i>)	ATGGGCGTGGCCGATGGAGT	TGG
r064	COP 2.9 Ex (<i>COP1/2-b</i>)	TTGCCAGGAATAGCCGGAAG	GGG
r067	PSR1.1 (<i>PSR</i>)	ACTAGCACCGAGCGTTGGCA	CGG
r071	COP 4.19B (<i>Chr2-b</i>)	GCTGCAGAAATCTCATGAACG	AGG
r072	ARG7.1 (<i>ARG7</i>)	GAGCGAGGAGCCGGTGGCGT	AGG
r084	ChR1.1 (162) (<i>ChR1</i>)	TGTGGCTTCGTTACGCGGAG	TGG
r086	COP7.1 (<i>COP7</i>)	GCTGGATTTCGACGGTGC GCG	AGG
r087	COP8.1 (<i>COP8</i>)	GGTGCAGGTCCAGCTTGCTG	CGG
r088	COP11/12.1 (<i>COP11/12</i>)	GGTCTGTCATCGCAATGACG	GGG
r090	RBP40.1-2 (<i>RBP40-c</i>)	CTTGTGCTCACC ACTCGT CG	GGG
r091	RBP40.3-2 (<i>RBP40-d</i>)	CTAACACCCACC ACTCGT CG	GGG
r097 ^s	COP6.1 (<i>COP6</i>)	GTTGTCTTCGAACAAGAGCG	AGG
r100	2-LOG.1 (<i>2-LOG-a</i>)	TGAGAGTTGTATTAGTCGCG	GGG
r101	2-LOG.2 (<i>2-LOG-b</i>)	ATACAACTCTCAACAAGCGC	TGG
r105 ^s	SNRK22.1 (<i>SNRK2.2-a</i>)	TAGCGAGGATGTCCAATCAG	GGG
r108	ChR2 (123) (<i>ChR2-a</i>)	AGTGGTTGCGTTACGCCGAG	TGG
r138	Cilik target1 (<i>CiliK-a</i>)	CCGGGATTTCGAAGCGACGGA	CGG
r139	Cilik target2 (<i>CiliK-b</i>)	CACCTCATCGATACGTCCG	CGG
r144	CAV2_ Ex5_1 (<i>CAV2-a</i>)	GGCGTACCGTCAATCAGCAT	GGG
r145	CAV2_ Ex5_2 (<i>CAV2-b</i>)	CTGCAATCATGGTTCGTCACG	AGG
r162	4-IPT.3 (<i>4-IPT-a</i>)	GGTGATTGTGACGGGGCCCA	CGG
r166	4-IPT.4 (<i>4-IPT-b</i>)	CCAGGCCATGTCTGACCCTG	CGG

Komplette SpCas9 Alt-R® crRNA-Sequenz (IDT) (Zielsequenz [N] + Gerüst-RNA)

N*N*N*(N)₄(N)₁₃ + GUUUUAGAGCUAU*G*C*U

SpCas9 Alt-R® tracrRNA-Sequenz (IDT)

A*G*CAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU*U
*U

Zielsequenzen der alternativen Cas-Nukleasen

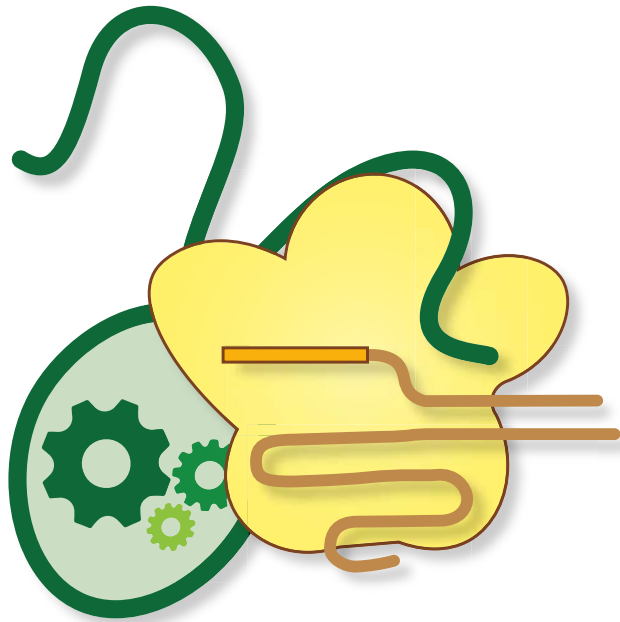
r031 (AsCas12a)	GTS-APH	GGGAGGCCCCCTCCGCCATGAGC	TTTG
r110 (SaCas9)	EMX1-1 (GTS)	GCCTCCCCAAAGCCTGGCCA	GGGAGT
r111 (LbCas12a)	GTS-APH	GGGAGGCCCCCTCCGCCATGAGC	TTTG

RNA-Sequenz der LbCas12a crRNA (r111) (Gerüst-RNA + Zielsequenz)

AAUUUCUACUAAGUGUAGAU + GGGAGGCCCCUCCGCCAUGAGC

RNA-Sequenz der SaCas9 sgRNA (r110) (Zielsequenz + Gerüst-RNA)

GCCUCCCCAAAGCCUGGCCA +
GUUUUAGUACUCUGAAACAGAAUCUACUAAAAACAAGCAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU



Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift eigenständig und alleinig unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen, Mitteilungen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Berlin, den

Simon Kelterborn