

**Untersuchungen zur gerichteten Insertion einer
funktionalen Genkassette mittels CRISPR/Cas in der
Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii***

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau M. Sc. Anne Kind

geb. in Dresden

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Pietzsch, MLU
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Humbeck, MLU
3. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Syldatk, KIT

Tag der öffentlichen Verteidigung: 24.06.2024

Wir lassen nie vom Suchen ab,
und doch am Ende allen unseres Suchens,
sind wir am Ausgangspunkt zurück
und werden diesen Ort zum ersten Mal erfassen.

T. S. Eliot; aus dem Film „Lola rennt“, 1998, Regisseur und Drehbuchautor: Tom Tykwer

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Anne Kind, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Anne Kind

Halle / Saale, den 08.01.2024

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Pietzsch, für seinen Glauben an mich, dieses herausfordernde Thema angehen zu können. Für die Etablierung des in der Arbeitsgruppe völlig neuen Organismus´ ermöglichte er mir diverse Dienstreisen, auf welchen ich die „Chlamy-Community“ kennenlernen durfte. Bei den meisten Literaturrecherchen konnte ich dann feststellen, mit wem ich schon einmal am Buffet stand;) Galt es des Weiteren neue Methoden auszuprobieren, Software oder Geräte zu beschaffen, immer konnte ich mich darauf verlassen, dass es eine Möglichkeit der Finanzierung geben würde. Besonders dankbar bin ich für seine Unterstützung während und nach der Schwangerschaft. Diese kommt, wie ich hörte, leider nicht allen jungen Wissenschaftlerinnen zugute.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Ramona Engelhardt für Ihre Unterstützung am Anfang des Projektes bedanken, für welches zunächst die Wahl der Methoden und das mittelfristige Ziel gefunden werden musste. Mein Dank gilt des Weiteren Frau Dr. Franziska Seifert. Obwohl sie nicht in meinem Projekt involviert war, konnte ich doch mit jeder Frage an ihre Tür klopfen und die (Un)Sinnhaftigkeit neuer Versuchsideen besprechen. Bei allen Fragen rund um PCR-basierte Methoden, konnte ich mich stets auf Herrn Dr. Bodo Moritz verlassen. Weitere Unterstützung bekam ich von studentischer Seite: Frau Adriana Trompetero González, Frau Juliane Blümke und Tobias Reinhard. Vielen Dank für alle Subkultivierungen und alle SPLINKEREien! Frau Sophie Wacker möchte ich für die Durchführung der ersten Transformationen im Rahmen ihrer Masterarbeit danken. Einen weiteren besonderen Dank möchte ich an Frau Dipl. Biol. Andrea Damm richten. Unermüdlich unterstützte Sie mich im letzten Abschnitt meiner Promotionszeit im Labor. Mein Dank geht außerdem an Frau Dipl. Ing. Martina Anwand, ohne die ich im Dschungel der EFRE-konformen Bestellungen wohl noch viel mehr Zeit verbracht hätte. Ich danke für das tolle Klima in der Arbeitsgruppe! Besonders danke ich meiner Freundin und Kollegin Constanze Zwies für ihr stets offenes Ohr.

Ich danke dir, Dr. Ivo Bertalan sowie Andre Breitbach und Marlies Wolf für eure Einführung in die Arbeit mit *Chlamydomonas reinhardtii*, für die Überlassung einiger Geräte und Materialien sowie der Basis-Protokolle im Umgang mit der Mikroalge.

Ich danke Dr. Simon Kelterborn für seine Zeit mir im Rahmen einer Dienstreise das Transformationsprotokoll nahezubringen. Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Hegemann für den Austausch auf der Konferenz in Washington und die Überlassung der Plasmide pPH75 und pPH114 herzlichst bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebenspartner, welcher in wirklich jeder erdenklichen Lebenslage für mich da ist. Sei es der Frust über ein missglücktes Experiment, das Gefühl der

Überforderung im Anbetracht der Herausforderung mehr oder weniger allein im Projekt zu sein oder auch die Freude, wenn dann doch mal eine Bande im Southern zu sehen war. Immer konnte man dies teilen und sich im besten Falle noch einen Tipp für den nächsten Versuch abholen. Auch die Ermahnung zur Pause war sehr wichtig! Nicht zu vergessen ist all die Zeit, in der du, Peter, auf unser Mäusekind aufgepasst hast, damit ich genügend Schreib-Zeit hatte. Eben dieser Dank gilt auch der gesamten Familie! Besonders möchte ich meinen Eltern danken, die neben der Betreuung von Lars mich meine gesamte Studienzzeit nicht nur finanziell, sondern auch moralisch unterstützten. Vielen Dank für eure unermüdliche Unterstützung in jeder Lebenslage!

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amp ^R bzw bla | Resistenz gegen <u>A</u> mpicillin |
| AphVIII | <u>A</u> minoglycosid-3'- <u>p</u> hosphotransferase Type <u>VIII</u> |
| ARS | <u>A</u> rylsulfatase |
| AS | <u>A</u> minosäure |
| CC-# | <u>C</u> hlamydomonas <u>c</u> ollection – Stammnummer, Minnesota |
| CCM | <u>c</u> arbon- <u>c</u> oncentrating <u>m</u> echanism |
| CHLREDRAFT | CHL: <u>C</u> hlamydomonas RE: <u>r</u> einhardtii, <u>D</u> raft: Entwurf; es handelt sich dabei um einen Genabschnitt, welcher für ein hypothetisches Protein codiert |
| CRISPR/Cas | <u>c</u> lustered <u>r</u> egularly <u>i</u> nterspaced <u>s</u> hort <u>p</u> alindromic <u>r</u> epeats/ <u>C</u> RISPR <u>a</u> ssociated <u>e</u> ndonuclease |
| crRNA | <u>C</u> RISPR <u>R</u> NA |
| cw | <u>c</u> ell <u>w</u> all <u>d</u> eficient |
| dAK_# | fortlaufende Nummer Reparatur-DNA-Donor |
| dCas | <u>d</u> ead <u>C</u> as, modifiziertes Cas-Protein, keine Nukleaseaktivität |
| DIG | <u>D</u> igoxigenin |
| DSB | <u>D</u> oppelstrangbruch |
| dsODN | <u>d</u> ouble <u>s</u> tranded <u>o</u> ligodesoxynucleotid |
| gDNA | genomische <u>D</u> NA |
| GTS | <u>g</u> ene <u>t</u> argeting <u>s</u> election |
| H(D)R | <u>h</u> omologous (directed) <u>r</u> ecombination |
| HSP70A | <u>h</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein <u>70A</u> |
| Hygro ^R | Resistenz gegen <u>H</u> ygromycin |
| I_ | <u>I</u> ntron |
| indel | <u>I</u> nsertion- <u>D</u> eletion, DNA-Sequenzvariation, bei denen eine Nukleotidsequenz in einem Genomabschnitt fehlt (Deletion) oder hinzugefügt wurde (Insertion) |
| KBE | <u>K</u> olonie- <u>b</u> ildende <u>E</u> inheit |
| KPCR | <u>K</u> olonie- <u>P</u> CR |
| LB | <u>l</u> ysogeny <u>b</u> roth |
| mt | <u>m</u> ating <u>t</u> ype |
| N/A | <u>n</u> ot <u>a</u> vailable |
| NHEJ | <u>n</u> on- <u>h</u> omologous <u>e</u> nd <u>j</u> oining |
| P_ | <u>P</u> romotor |
| PAM | <u>p</u> rotospacer <u>a</u> djacent <u>m</u> otiv |
| PCI | <u>P</u> henol- <u>C</u> hloroform- <u>I</u> soamylalkohol |
| pParo | <u>P</u> lasmid, vermittelt Resistenz gegen <u>P</u> aromomycin, auch als pAphVIII bezeichnet |
| pPH | <u>P</u> lasme, entwickelt im <u>P</u> eter <u>H</u> egemann Lab |
| prAK_# | fortlaufende Nummer <u>P</u> rimers |
| Rap ^R | Resistenz gegen <u>R</u> apamycin |
| RBCS2 | <u>r</u> ibulose <u>b</u> isphosphate <u>c</u> arboxylase <u>s</u> mall <u>s</u> ubunit, chloroplastic <u>2</u> |
| RME | <u>R</u> eparatur- <u>M</u> odus- <u>E</u> ffizienz |
| RNA | <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid |
| RNP | <u>R</u> ibonukleoprotein |
| RuBisCo | <u>R</u> ibulose-1,5- <u>b</u> isphosphat- <u>c</u> arboxylase/- <u>o</u> xigenase |
| Pm ^R bzw. paro | Resistenz gegen <u>P</u> aromomycin |
| RT | <u>R</u> aum <u>t</u> emperatur |
| sgRNA | <u>s</u> ingle <u>g</u> uide <u>R</u> NA |

| | |
|----------|--------------------------------------------------|
| SNRK2.2 | <u>SNF1-related protein kinase 2.2</u> |
| ssODN | <u>single stranded oligodesoxynucleotid</u> |
| strAK_# | fortlaufende Nummer Stämme |
| T_ | <u>T</u> erminator |
| TAP | <u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>P</u> hosphate |
| Tm | <u>m</u> elting <u>t</u> emperature |
| tracrRNA | <u>t</u> rans- <u>a</u> ctivating <u>c</u> rRNA |
| ü. N. | <u>ü</u> ber <u>N</u> acht |
| VR | <u>V</u> ektor <u>r</u> ückgrad |
| WT | <u>W</u> ild <u>t</u> yp |
| ZNF | <u>Z</u> ink <u>f</u> inger <u>n</u> uklease |

Für biochemische Fachausdrücke wurden die international üblichen Abkürzungen verwendet.

Hinweis zur Nomenklatur:

In Übereinstimmung mit den von der *Chlamydomonas*-Gesellschaft festgelegten Regeln zur Nomenklatur von Genen (<https://www.chlamycollection.org/resources/tools/gene-nomenclature>) werden in der vorliegenden Arbeit DNA- und Protein-Sequenzen folgendermaßen angezeigt:

| | | |
|-----------------------------------------------|------------------------------|----------------------|
| Kerncodiertes Gen aus <i>C. reinhardtii</i> : | Großbuchstaben, kursiv | Bsp.: <i>CpSRP43</i> |
| Protein aus <i>C. reinhardtii</i> : | Großbuchstaben, nicht kursiv | Bsp.: CpSRP43 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Selbstständigkeitserklärung | I |
| Danksagung | II |
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| Inhaltsverzeichnis | VI |
| 1 Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| 1.1 Einleitung | 1 |
| 1.1.1 Biotechnologische Produktion von Werkstoffen..... | 1 |
| 1.1.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als potenzieller Produktionsorganismus | 2 |
| 1.1.3 Mechanismen zur Erhaltung der genomischen Integrität | 5 |
| 1.1.4 Genome Editing | 10 |
| 1.1.4.1 <i>Werkzeuge der Gentechnik: von der ungerichteten Mutagenese bis zum Genome Editing</i> | 10 |
| 1.1.4.2 <i>Ein historischer Abriss: das CRISPR/Cas-System</i> | 12 |
| 1.1.4.3 <i>Die Funktionsweise des CRISPR/Cas-Systems</i> | 13 |
| 1.1.4.4 <i>Anwendungen des CRISPR/Cas-Systems</i> | 15 |
| 1.1.5 Der <i>SNF1-related protein kinase 2.2</i> - Lokus..... | 18 |
| 1.1.6 Funktionsweise der Aminoglycosid-3-phosphotransferase | 21 |
| 1.1.7 Bewertung des Erfolgs der Genom Editierung..... | 21 |
| 1.2 Zielsetzung und Motivation..... | 22 |
| 2 Material und Methoden | 24 |
| 2.1 Material | 24 |
| 2.1.1 Chemikalien | 24 |
| 2.1.2 Geräte und zusätzliche Materialien | 26 |
| 2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien | 29 |
| 2.1.4 Enzyme, Reagenzien, Antikörper und Kits für die Molekularbiologie | 32 |
| 2.1.5 RNA und Primer | 34 |
| 2.1.6 DNA-Reparatur-Donore..... | 36 |
| 2.1.7 Vektoren und Kulturstämme | 37 |
| 2.2 Methoden | 38 |
| 2.2.1 Design der gRNA und Assemblierung des RNP-Komplexes | 38 |
| 2.2.2 Zellkultivierung und Synchronisation | 39 |
| 2.2.3 Zellzahlbestimmung | 40 |
| 2.2.4 Kryokonservierung und Aufweckung | 41 |
| 2.2.5 Agarosegelelektrophorese..... | 41 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.2.6 | Bereitstellung der DNA-Reparatur-Donoren | 41 |
| 2.2.6.1 | <i>Bereitstellung der plasmidären Donoren: Isolation von Plasmiden aus E. coli</i> | 41 |
| 2.2.6.2 | <i>Bereitstellung der lineare, doppelsträngigen Donoren: M13-PCR und Gelextraktion</i> | 41 |
| 2.2.6.3 | <i>Bereitstellung der linearen, einzelsträngigen Donoren</i> | 42 |
| 2.2.7 | Transformation | 43 |
| 2.2.8 | Farbtest..... | 44 |
| 2.2.9 | Kolonie-PCR (KPCR) | 45 |
| 2.2.10 | Isolation der Gesamtzell-DNA mittels PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol) | 47 |
| 2.2.11 | Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung..... | 48 |
| 2.2.12 | Effizienzbestimmungen | 49 |
| 2.2.13 | Southern Blot | 50 |
| 3 | Ergebnisse | 54 |
| 3.1 | Untersuchung des Einflusses des RNP-Komplexes auf die Vitalität von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 57 |
| 3.2 | Bestimmung der Selektionsfrequenz | 58 |
| 3.3 | Bestimmung der Selektionseffizienz..... | 65 |
| 3.4 | Bestimmung der Targeteffizienz..... | 67 |
| 3.5 | Bestimmung der Reparatur-Modus-Effizienz zur Quantifizierung eines präzisen und vollständigen Insertionsereignisses..... | 69 |
| 3.5.1 | Untersuchung der Doppelstrangbruchstelle mittels Sanger-Sequenzierung | 72 |
| 3.5.2 | Untersuchung der inserierten Sequenzen | 79 |
| 3.5.3 | Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Reparatur-Modus-Effizienzen..... | 96 |
| 3.6 | Untersuchung der Insertionsfrequenz mittels Southern Blot | 101 |
| 4 | Diskussion | 108 |
| 4.1 | Einordnung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Selektionsfrequenzen und Effizienzen in die Literatur..... | 109 |
| 4.1.1 | Selektionsfrequenz & -effizienz | 110 |
| 4.1.2 | Targeteffizienz & Reparatur-Modus-Effizienz | 113 |
| 4.2 | CRISPR/Cas als <i>knock in</i> Methode | 122 |
| 5 | Zusammenfassung | 126 |

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------|------------|
| 6 | Ausblick | 128 |
| 7 | Literatur | 130 |
| 8 | Anhang..... | 141 |
| 8.1 | Vektorkarten und Sequenzinformationen..... | 141 |
| 8.2 | Hinweise zur Nutzung des digitalen Anhangs..... | 144 |
| 8. | Lebenslauf | 145 |

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

1.1.1 Biotechnologische Produktion von Werkstoffen

Die Biotechnologie ist ein anwendungsorientierter und interdisziplinärer Wissenschaftszweig. Es kommen u.a. Erkenntnisse aus der Mikrobiologie, Molekularbiologie und Genetik zusammen, um Lebensmittezzusatzstoffe, pharmazeutische Produkte, Fein- und „Bulk“-Chemikalien, Biokraftstoffe und Enzyme für verschiedenste Anwendungen herzustellen. Doch die Biotechnologie ist keineswegs eine junge Wissenschaft. Ihre Tradition reicht mehrere Jahrtausende zurück. Mit der Herstellung von Wein und Bier beispielsweise wurden schon damals Mikroorganismen genutzt, um aus Zuckern Alkohole zu generieren. Auch die Verarbeitung von Milch zu Käse ist ein solches Beispiel. Mit Hilfe tierischen Labs wurde, und in traditionellen Käsereien wird auch heute noch, Käse produziert. Was damals eher auf zufälligen Beobachtungen basierte, wurde ab dem 19. Jahrhundert konkreter. Man begann zu verstehen, dass es Mikroorganismen gibt, die für die Produktion dieser Lebensmittel unabdingbar sind. Ab dem 20igsten Jahrhundert rückten molekularbiologische, genetische und gentechnische Erkenntnisse in den Fokus und konnten nutzbar gemacht werden. Insulin ist womöglich das berühmteste Beispiel für eine biotechnologische Errungenschaft im medizinischen Bereich. Mit Hilfe des Mikroorganismus *Escherichia coli* konnte im Jahre 1979 durch Insertion der für das humane Insulin codierenden Sequenz das Peptidhormon gewonnen werden [Goeddel et al., 1979].

In unserer modernen Zeit sind wir mit der Notwendigkeit konfrontiert, Stoffkreisläufe zu schließen und dem anthropogenen Klimawandel entgegenzutreten. Von der Biotechnologie können wichtige Forschungsimpulse für eine zukünftige biobasierte Wirtschaft, die sogenannte „Bioökonomie“, ausgehen. Die Bundesregierung hat die Bioökonomie definiert als „die Erzeugung, Erschließung und Nutzung biologischer Ressourcen, Prozesse und Systeme, um Produkte, Verfahren und Dienstleistungen in alle wirtschaftlichen Sektoren für ein zukunftsfähiges Wirtschaftssystem bereitzustellen“ (Link siehe Literaturverzeichnis).

Im Zentrum der Bioökonomie stehen maßgeschneiderte Produktionsorganismen, die selbst vermeintliche Abfälle als Kohlenstoffquelle nutzen können. Das deutsche Startup „COLIPI“ beispielsweise nutzte Hefestämme, die nicht nur aus Basis von C5- oder C6-Zuckern wachsen können, sondern auch Fettreste verstoffwechseln können (Link siehe Literaturverzeichnis), um daraus eine Alternative zum Palmöl herstellen zu können. Andere Mikroorganismen sind so verändert, dass sie Holz als Nahrungsquelle nutzen können [Zheng et al., 2012]. Auch wurden

Bakterien gefunden, die für biologische Brennstoffzellen in Frage kommen (*Geobacter sulfureducens*, Link siehe Literaturverzeichnis). Mit dem Blick auf das Ziel, den atmosphärischen CO₂-Gehalt zu senken, kommen Algen ins Spiel. Experimente mit Algenkulturen, die industrielle Abgase als Kohlenstoffquelle nutzen, wurden zu diesem Zweck bereits durchgeführt [Alami et al., 2021]. In der Algenbiotechnologie werden bisher vor allem die Arten *Dunaliella salina* und *Haematococcus pluvialis* (die „Blutregen-Alge“) für die Produktion der Lebensmittelfarbstoffe β-Carotin [Kleinegris et al., 2011] und Astraxanthin genutzt [Li et al., 2011]. Durch eine Stickstoff-Mangel-Kultivierung ist eine erhöhte Produktion dieser Pigmente in den Wildtyp-Stämmen möglich [Deyab et al., 2021]. Möchte man andere Wertstoffe gewinnen, so wird der Einsatz von genetisch veränderten Organismen interessant. Die Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde als Modelorganismus für z.B. die Aufklärung der Photosynthese genutzt, ihr Genom ist sequenziert, sodass eine Veränderung technisch möglich ist.

1.1.2 *Chlamydomonas reinhardtii* als potenzieller Produktionsorganismus

Die Art *Chlamydomonas reinhardtii* gehört der Abteilung der *Chlorophyta* (Grünalge) an. Es handelt sich um einen einzelligen Eukaryoten im Reich der Pflanzen. Der Gattungsname *Chlamydomonas* setzt sich aus dem griechischen Wort *chlamys*, was so viel wie Umhüllung heißt, und *monas*, solitär lebend, zusammen. Der Gattungsname wurde von C.G. Ehrenberg in den 1830igern eingeführt, der Arname *Chlamydomonas reinhardtii* wurde von Ettl in den 1960igern geprägt [Harris (Hrsg.), 2009, „Chlamydomonas Sourcebook“ Vol. 1, S. 1f]. Die Gruppe um Melkonian schlug eine Neudefinition dieser Artbezeichnung basierend auf dem 1945 von G.M. Smith nahe Amherst in Massachusetts isolierten Basisstamm „137c“ vor [Pröschold et al., 2001]. Demnach sind folgende Merkmale für die Zuordnung entscheidend: Existenz eines apikalen Zilienpaares mit jeweils gleicher Länge, einer Zellwand sowie eines Chloroplasten mit einem oder mehreren Pyrenoiden. Eine lichtmikroskopische Aufnahme einiger Vertreter von *C. reinhardtii* sowie dessen Zellorganellen sind in Abbildung 1.1.2-1 abgebildet.

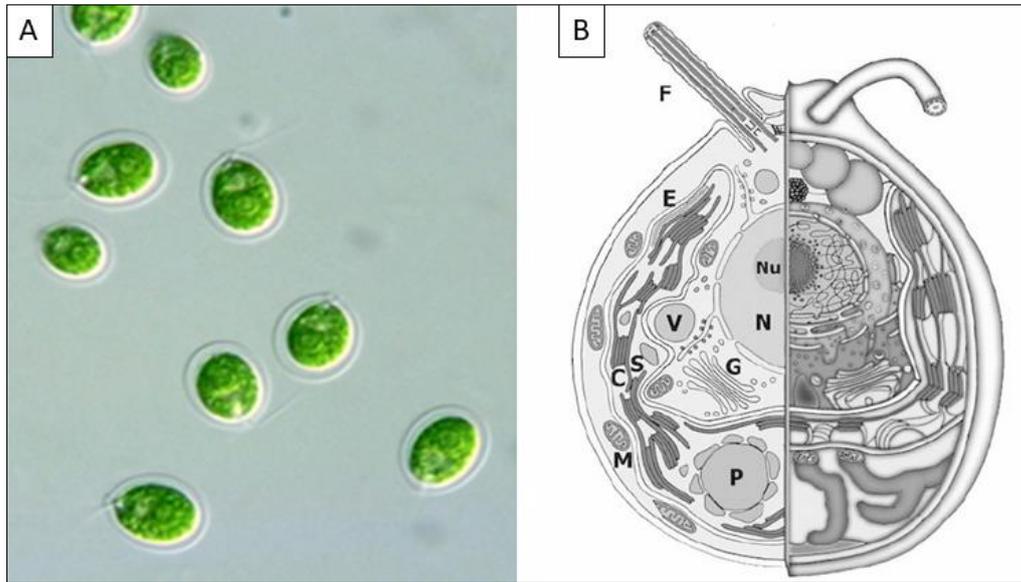


Abbildung 1.1.2-1: Darstellung des Einzellers Chlamydomonas, A: lebende Zellen in Suspensionskultur (protist.i.hosei.ac.jp, Stand: 25.08.2021) und B: Querschnitt der Zelle als Übersichtszeichnung [Nickelsen und Kück, 2000], N: Zellkern, Nu: Nukleolus (Kernkörperchen), F: Flagellen (Zilien), C: becherförmiger Chloroplast, E: Augenfleck, P: Pyrenoid, M: Mitochondrien, G: Golgi-Vesikel, S: Stärkekörner & V: Vakuole.

Die Zellform von *C. reinhardtii* ist ellipsoid bis kugelförmig, die Zellgröße variiert von 10 – 15 μm . Ausgestattet mit zwei Zilien (F) und einem Augenfleck (E) ist es der Mikroalge möglich, Phototaxis [Berthold et al., 2008] und Chemotaxis [Ermilova et al., 1996] zu betreiben;. Außerdem können sie von einer gallertartigen Hülle ummantelt sein. Diese, hauptsächlich aus sauren Polysacchariden [Crayton, 1982] und Hydroxyprolin-reichen Glycoproteinen bestehende Hülle wird vor allem als Schutz gegen äußere Umweltfaktoren (pH-Wert, Anwesenheit von Fressfeinden) beschrieben [Lurling und Beekman, 2006]. *Chlamydomonas* kann sowohl in Böden als auch in aquatischen Habitaten wachsen. Neben der autotrophen Lebensweise durch Photosynthese, wobei Kohlenstoffdioxid als C-Quelle dient, ist auch eine mixo- oder heterotrophe Lebensweise auf Basis von Acetat möglich [Harris (Hrsg.), 2009, „Chlamydomonas Sourcebook“ Vol. 1, S. 242]. Der sogenannte Kohlenstoff-Konzentrationsmechanismus (*carbon-concentrating mechanism*, CCM) [Moroney und Somanchi, 1999] ist für die Fixierung von CO_2 zuständig, dessen Hauptorganell der Pyrenoid (Abbildung 1.1.2-1 P) [Mitchell et al., 2017] darstellt. Die Matrix des Pyrenoiden ist mit dem Enzym RuBisCo (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxigenase) dicht gepackt [Freeman Rosenzweig et al., 2017] und durchzogen mit Röhrchen [Ohad et al., 1967], welche in die Thylakoidmembranen übergehen. Der Pyrenoid ist für Algen, welche in aquatischen Habitaten leben, besonders wichtig. Andernfalls könnte die Diffusion von CO_2 ein limitierender Faktor für die Photosynthese darstellen.

Die Mikroalge *C. reinhardtii* verfügt über drei Genome: das Chondrom (Genom der Mitochondrien), das Plastom (Genom des Chloroplasten) und das Karyom (Kerngenom). Alle

diese Genome sind vollständig sequenziert (DOE Joint Genome Institute, Referenzstamm CC-503 cw92 (mt+); DDBJ/EMBL/GeneBank Accession#: ABCN00000000 [Merchant et al., 2007]). Das Chondrom kodiert vor allem für die Proteine der großen ribosomalen Untereinheit sowie anteilig für an der Atmungskette beteiligten Enzyme. Der GC-Gehalt liegt bei 45,2 % und es umfasst eine Größe von 15,8 kb, womit es eine ähnliche Größenordnung wie das Mitochondrium-Genom des Menschen (16,6 kb, GenomeProject: 30353, Accession#: AC_000021) aufweist. Das Plastom ist in ringartigen Strukturen organisiert. Der becherartige Chloroplast, welcher einen großen Anteil der Zelle ausmacht, beinhaltet 80 bis 100 Kopien dieser DNA-Ringe. Sie sind in sogenannten Nukleoproteinkomplexen formiert und schwimmen im Stroma [Lopez et al., 2015]. Das Plastom kodiert hauptsächlich für Proteine des Photosystems I & II, rRNAs, der großen Untereinheit der RuBisCo und den Elektronentransport. Andere Enzyme, wie z.B. LHCPs (*light-harvesting chlorophyll- and carotenoid-binding proteins*) verfügen über ein Signalpeptid, welches diese von ihrem Bildungsort im Cytosol ins Chloroplasteninnere transportiert [Robinson und Klösgen, 1994]. Es herrscht also ein reger Austausch zwischen den Organellen. Mit einer Größe von 203,8 kb ist das Plastom 10fach größer als das Chondrom und liegt mit einem GC-Gehalt von 34,5 % unter dem Wert des Chondroms. Das Kerngenom ist in 17 Chromosomen organisiert und die vegetativen Zellen sind haploid. Mit einer Größe von ca. 112 Mb [Lopez et al., 2015] ist es fast so groß wie das Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* (125 Mb [The Arabidopsis Genome, 2000], im Vergleich: das humane Genom entspricht ca. 3200 Mb [Lander et al., 2001], International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Mit einem GC-Gehalt von 64 % [Merchant et al., 2007] gehört das Karyom von *C. reinhardtii* zu den GC-reichen Organismen (im Vergleich: *A. thaliana*: 36 %, human: 41 %, *E. coli*: 51 % (E. coli K12 Genome Browser, Accession: eschColi_K12)).

Als Modellorganismus wurde *C. reinhardtii* genutzt, um u.a. die physiologischen Prozesse der Photosynthese aufzuklären [Davies und Grossman, 1998], die Struktur und den Aufbau der Zilien zu studieren und daraus gewonnene Erkenntnisse für Erkrankungen beim Menschen abzuleiten (Polycystic Kidney Disease [Huang et al., 2007], [Harris (Hrsg.), Pazour & Witman, 2009, „Chlamydomonas Sourcebook“ Vol. 3, S. 445 – 478]. Adaptive Prozesse in Bezug auf Licht [Berthold et al., 2008] und Nährstoffangebote [Ermilova et al., 1996] in Verbindung mit der *circadian clock* [Byrne et al., 1992]; Review: [Mittag und Wagner, 2003] konnte mit Hilfe dieses Organismus´ studiert werden. *C. reinhardtii* ist deshalb so interessant für die Arbeit im Labor, da die Mikroalge mit einer Verdopplungszeit von 6 - 8 h wesentlich kürzere Generationszeiten hat als höhere Pflanzen (im Vergleich: *A. thaliana* 5 - 6 Wochen [Meyerowitz, 1989]). Der haploide Chromosomensatz macht das Generieren stabiler

Transformationen einfacher und die phototrophe, mixotrophe und heterotrophe Lebensweisen ermöglichen Spielraum bei der Anzucht.

1.1.3 Mechanismen zur Erhaltung der genomischen Integrität

Die zelleigenen Mechanismen für die Reparatur eines DNA-Doppelstrangbruchs (DSB) werden in der vorliegenden Arbeit für einen erfolgreichen Einbau von Fremd-DNA in *C. reinhardtii* genutzt und sollen deshalb an dieser Stelle übersichtweise vorgestellt werden. Die Reparaturmechanismen wurden in tierischen Zellen aufgeklärt. Es wird angenommen, dass in pflanzlichen Zellen die Reparatur vergleichbar abläuft, da eine Vielzahl an konservierten Bereichen jener Proteine, die an der Reparatur eines Doppelstrangbruchs beteiligt sind im Reich der Bakterien, Archaeen und Eukaryoten, konserviert sind [Aravind et al., 1999].

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) stellen ein schwerwiegendes Problem für jede Zelle dar, denn diese können zum Verlust der genetischen Integrität führen. Deshalb ist es oberste Priorität diesen Bruch zu reparieren. Die am häufigsten beschriebenen Reparaturmechanismen sind die Mechanismen der homologen Rekombination (HR) und des *canonical non-homologous end joining* (c-NHEJ). Die Entscheidung darüber, ob ein DSB über den c-NHEJ-, den HR- oder alternative Mechanismen (siehe Abbildung 1.1.3-1) repariert wird, wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Die Komplexität des DSB, der Zustand des Chromatins sowie die Zellzyklusphase spielen dabei eine entscheidende Rolle [Trenner und Sartori, 2019a]. Der c-NHEJ ist weitestgehend Zellzyklus-unabhängig, findet aber vor allem in der G1-Phase des Zellzyklus statt [Iyama und Wilson III, 2013], wohingegen HR auf dem Vorhandensein eines Schwesterchromatids als Reparaturtemplete beruht und damit in der beginnenden S-Phase bis zum Übergang S/G2-Phase möglich ist [Kadyk und Hartwell, 1992]; [Takata et al., 1998]. Auf diese sowie alternative Mechanismen wird im Folgenden eingegangen. In Abbildung 1.1.3-1 ist eine Übersicht über die bekannten Reparaturmechanismen gezeigt.

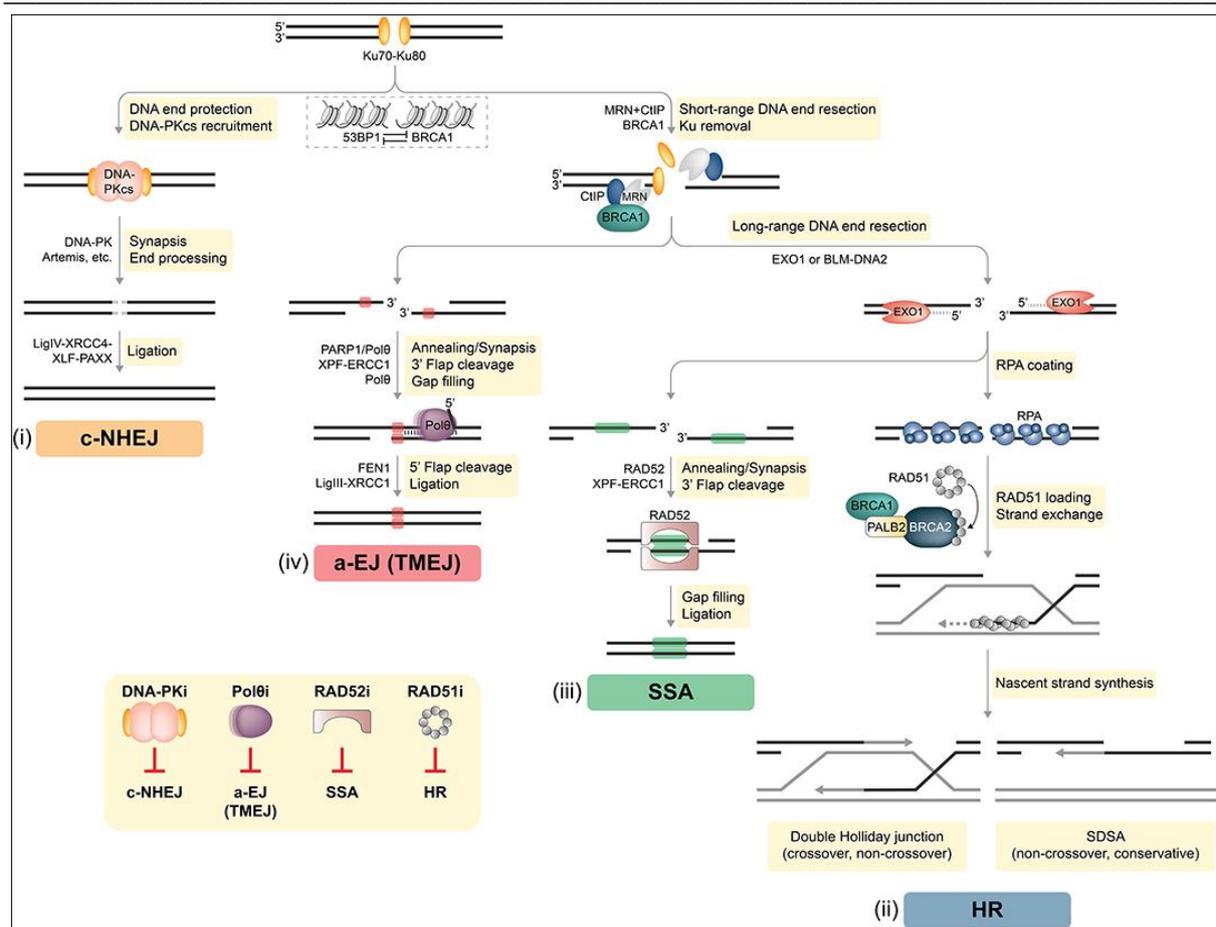


Abbildung 1.1.3-1: Übersicht über die zelleigenen Reparaturmechanismen: (i) c-NHEJ (canonical non-homologous end-joining), (ii) HR (homologous recombination), (iii) SSA (single strand anealing) oder (iv) a-EJ (auch als altEJ oder TMEJ bezeichnet: alternative end-joining oder polymerase θ-mediated end-joining). Die Abbildung wurde dem Review von [Trenner und Sartori, 2019a] entnommen, welche die Reparaturmechanismen in tierischen Zellen beschreibt.

Abkürzungen: BRCA1: breast cancer 1, 53BP1: Tumorsuppressor-p53-bindendes Protein 1, KU: Heterodimer Ku70-Ku80, DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, XRCC4-XLF-PAXX: X-ray repair cross-complementing 4 - Cernunnos-XRCC4-like factor - XRCC4 like small protein, MRN: MRE11-RAD50-NBS1, CtIP: CtBP (C-terminal binding protein) interacting protein, EXO1: Exonuklease 1, BLM: bloom syndrom helikase, RPA: Poly(ADP-ribose)-polymerase 1, SDSA: synthesis-dependent strand anealing, PARP1: Poly(ADP-ribose)-polymerase 1, FEN1: Flap-Endonuklease 1

c-NHEJ

Die c-NHEJ ist definiert als ein Reparaturmechanismus, bei welchem eine direkte Ligation der Bruchenden des DSBs durchgeführt wird. Jedoch ist nicht jeder DSB gleich, es können verschiedene Überhang-Polaritäten und -Längen oder chemische Modifikationen der Nachbarnukleotide das Milieu beeinflussen. Sind die Überhänge vollständig kompatibel zueinander, ist die direkte Ligation möglich. Bei einem komplizierteren Bruch stellt eine akkurate Reparatur eine Herausforderung dar und es kann zu Fehlern – kommen, die zu lokalen Mutationen führen können. Dennoch trägt dieser Reparaturmechanismus zur Beibehaltung der genetischen Integrität bei [Difilippantonio et al., 2000]. Der c-NHEJ-Mechanismus ist

Zellzyklus-unabhängig, tritt aber vor allem in vegetativen Zellen auf, bei denen kein Schwesterchromatid als Reparatur-Donor dienen kann. Grundsätzlich kann man den Mechanismus in drei Phasen einteilen:

1. Erkennung und Bindung des DSBs durch das Heterodimer KU
2. Verarbeitung und Beschnitt der Strangenden in ligierbare Enden
3. Verknüpfung der Enden durch die Ligase IV

Das erste Protein, welches an den DSB assoziiert, ist die KU. KU ist ein Heterodimer aus Ku70 und 80, benannt entsprechend der Proteingrößen. Es handelt sich dabei um einen DSB-Endbindenden Proteinkomplex, welcher das lose DNA-Ende in seine Nadelöhr-artige 3-D-Stuktur „einfädeln“ kann [Walker et al., 2001] und damit die Bruchenden schützt (Abbildung 1.1.3-2). Die Bindung der KU rekrutiert im weiteren Schritt die DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytical subunit*). Die DNA-PKcs bildet das an der DNA-Synapse beteiligte DNA-PK-Holoenzym [Yaneva et al., 1997], welches die begrenzte Verarbeitung inkompatibler oder chemisch veränderter DNA-Enden durch Nukleasen (z. B. Artemis) und andere Enzyme koordiniert [Pannunzio et al., 2018]. Die DNA-Ligase IV (Uniprot: A0A2K3DNU1) katalysiert den ATP-abhängigen Transfer von den für die Ligation notwendigen Phosphaten. XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing 4*) und Cernunnos-XLF (*XRCC4-like factor*) formen zusammen mit der DNA Ligase 4 einen Komplex und stimulieren dadurch die Ligase, [Riballo et al., 2009], welche so den Ligationsschritt ausführt.

Der c-NHEJ ist der vornehmliche Reparaturmechanismus, da dieser erheblich schneller ist (in tierischen Zellen: 30 min für den c-NHEJ und bis zu 7 h für den HR [Mao et al., 2008]). Jedoch kann es bei komplexen DSB-Stellen zu einer Verlangsamung des c-NHEJ kommen. Befindet sich die Zelle dann in der S-Phase oder dem Übergang von S zur G2-Phase, kann der Mechanismus der HR den der c-NHEJ ablösen [Chiruvella et al., 2013]. Wie bereits angedeutet, findet die HR vor allem in der S und G2-Phase des Zellzyklus statt, genau dann, wenn ein Schwesterchromatid als Reparaturtemplate zur Verfügung steht. Die Resektion, also die Deletion von Nukleotiden, am 5'-Ende findet unter der Kontrolle des Zellzyklus statt, genauer gesagt unter der Kontrolle der CDK (*cyclin-dependent kinase*)-Aktivität während der S-Phase. Durch die CDK wird eine Art Zeitfenster für den HR-Mechanismus eingeräumt [Chiruvella et al., 2013]. Das Vorhandensein der KU inhibiert die Resektion in der G1-Phase, wenn die CDK-Aktivität gering ist, nicht aber in der S und S/G2-Phase [Clerici et al., 2008].

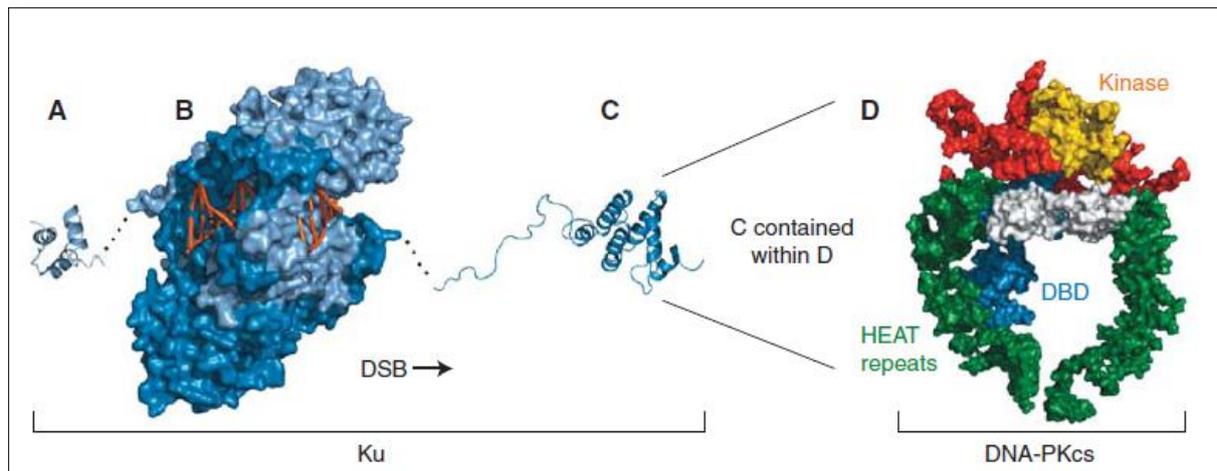


Abbildung 1.1.3-2: 3-D-Strukturdarstellung der Ku und DNA-PKcs. A) C-terminale Domäne der humanen Ku70 (PDB 1JJR) [Zhang et al., 2001]; B) Humane KU70/80 Heterodimer an DNA gebunden (PDB 1JEY) [Walker et al., 2001]; C) C-terminale Domäne der humanen Ku80 (PDB 1RW2) [Zhang et al., 2004]. Punktlinie: Verbindung zwischen Strukturen, hellblau: Ku70, blau: Ku80, orange: DNA. D) Struktur der humanen DNA-PKcs zusammen mit der C-terminalen Domäne der Ku80 (PDB 3KGV) [Sibanda et al., 2010]. Gelb: Kinase-Domäne, grün: HEAT repeats, weiß: „brow“, blau: putative DNA-Bindedomäne & rot: Rest. Die Abbildung ist dem Review von [Chiruvella et al., 2013] entnommen.

Abkürzungen: DSB: Doppelstrangbruch, HEAT: Huntingtin-Elongation-A-TOR, DBD: DNA-Bindedomäne, DNA-PKcs: DNA-PK catalytic subunit

HR

Die HR wird durch die Resektion von DNA-Enden eingeleitet [Ira et al., 2004]. Zunächst erkennt der MRN-Komplex (MRE11-RAD50-NBS1) den DSB und fördert mit Hilfe von BRCA1 (breast cancer 1) und CtIP (CtBP (C-terminal binding protein) interacting protein) die begrenzte Resektion des 5'-Strangs. Anschließend werden durch eine umfassendere 5'-3'-Resektion durch die EXO1 (Exonuklease 1) oder durch die BLM (bloom syndrom helikase) zusammen mit der DNA2-Nuklease lange 3'-ssDNA-Überhänge generiert [Zhu et al., 2008]. Diese werden durch das Protein RPA (Replication protein A) geschützt und stabilisiert. RAD51 (DNA repair protein RAD51), eine DNA-abhängige ATPase, konkurriert mit RPA um die Bindung an die DNA. Der BRCA1-PALB2-BRCA2-Komplex [Sy et al., 2009] sorgt für die Ablösung des RPA und die Bindung RAD51 auf ssDNA, wodurch sich Nukleoproteinfilamente bilden [Ogawa et al., 1993]. Die Formation der RAD51-Filamente führt direkt zu HR, bei potentiell mutagenen Mechanismen, wie der SSA (single strand annealing) hingegen wurde die Anwesenheit von Rad51 nicht beobachtet [Ivanov et al., 1996]. Auf die *template*-abhängige Strangerweiterung folgt die SDSA (synthesis-dependent strand annealing), was zu einer *non-crossover*-Genkonversion führt. Alternativ dazu bildet das Einfangen der zweiten ssDNA durch den *D-loop* Doppel-Holliday-Struktur, die entweder als *non-crossover* oder als *crossover* aufgelöst werden kan[Liu und West, 2004].

Bisherige Studien zeigen, dass es neben den sequenziellen Mechanismen der c-NHEJ & HR noch weitere Wege gibt. In Abbildung 1.1.3-1 sind die Mechanismen der SSA (*single-strand annealing*) und TMEJ (*polymerase theta-mediated end-joining, auch als MMEJ (microhomology-mediated end joining) oder alt-EJ (alternative end joining)*) bezeichnet) gezeigt (siehe Abbildung 1.1.3-1 iii & iv). Die beiden Mechanismen werden im Folgenden kurz beschrieben. TMEJ, SSA & HR sind Mechanismen, welche vor allem in der S/G2-Phase des Zellzyklus auftreten.

SSA

SSA erfordert mindestens 63-89 Basenpaare Sequenzhomologie beider Stränge der zu reparierenden Sequenz [Sugawara und Haber, 1992], die typischerweise zwischen repetitiven Elementen (als grüne Bereiche in Abbildung 1.1.3-1 dargestellt) im Genom zu finden sind. Anschließend fördert RAD52 das *annealing* von komplementärer ssDNA und die verbleibenden nicht-homologen 3'-Überhänge werden von der Nuklease ERCC1-XPF gespalten [de Laat et al., 1998]. Die Faktoren, die das Füllen von Lücken und die Ligation während der SSA fördern, sind noch weitgehend ungeklärt [Trenner und Sartori, 2019b].

TMEJ

Im Gegensatz zu SSA werden bei TMEJ kurze MHs (Mikrohomologien) von 2-20 bp (als rote Bereiche in Abbildung 1.1.3-1 (iv) dargestellt) verwendet, um die beiden DNA-Stränge am DSB zu verbinden. Im Gegensatz zur SSA und HR ist ein Merkmal der TMEJ die Resektion der 5'-Enden am DSB [Grabarz et al., 2012].

Generell teilen TMEJ und die HR die initialen Resektionsmechanismen, welche durch die Mre11-Nuklease und die CtIP (CtBP (*C-terminal binding protein*) *interacting protein*) ausgelöst werden [Truong et al., 2013]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass TMEJ und HR denselben regulatorischen Einflüssen unterliegen. Eine begrenzte Resektion während der G1-Phase wird hier als möglicher Weichensteller in Betracht gezogen [Yun und Hiom, 2009].

PARP1 (Poly(ADP-ribose)-polymerase 1) ist an der Förderung der DNA-Endsynapse [Audebert et al., 2004] und der Rekrutierung der spezialisierten DNA-Polymerase θ an DSBs beteiligt [Mateos-Gomez et al., 2015]. Die Assoziation der PARP1 an die DNA wird als Plattform für die Rekrutierung der alternativen Reparaturfaktoren diskutiert (Review: [Chiruvella et al., 2013]. Bemerkenswert ist, dass die DNA-PK hier keine Rolle spielt [Truong et al., 2013]. Im weiteren Schritt stabilisiert die Pol θ MH-vermittelte Verbindungen zwischen den beiden DNA-Enden, die als Primer für die *fill-in*-Synthese dienen. 3'-Überhänge, die sich von den Verbindungsstellen erstrecken, werden von der Nuklease ERCC1-XPF [de Laat et al.,

1998] entfernt. Die FEN1 (Flap-Endonuklease 1) wird mit der Entfernung von 5'-Überhängen (*flaps*) in Verbindung gebracht, die durch Polymerase-vermittelte Strangverschiebung entstehen [Patel et al., 2012], während der DNA-Ligase III-XRCC1-Komplex [Nash et al., 1997] für den abschließenden Ligationsschritt wichtig ist.

Indel

Bei den beschriebenen Reparaturmechanismen kann es zu sog. „Indels“ kommen. Das Wort Indel beschreibt Mutationen im Genom, die bis zu 50 Nukleotide lang sein können. Indel ist dabei ein Kofferwort aus Insertion und Deletion. Der Begriff wurde im Zuge des 1000-Genom-Projektes [Consortium, 2010] definiert und tritt bei CRISPR-Cas medierten Mutationen auf.

1.1.4 Genome Editing

1.1.4.1 Werkzeuge der Gentechnik: von der ungerichteten Mutagenese bis zum Genome Editing

Funktionsstudien, die Aufklärung von biochemischen Mechanismen oder die Produktion biotechnologisch relevanter Stoffe können mit Hilfe von Werkzeugen der Gentechnik durchgeführt werden. Möchte man eine Veränderung im Genom eines Organismus vornehmen, so kann dies gezielt oder ungerichtet (*random*) geschehen. Ungerichtete Mutationen entstehen zum Beispiel durch die Behandlung mit Mutagenen (UV-Strahlung, toxische Agenzien wie z.B. EMS (Ethylmethansulfonat)) [Hyams und Davies, 1972].

Auch die Methode der Insertionsmutagenese zählt zu den ungerichteten Veränderungen. Vor allem im Zuge der Genomsequenzierung von *C. reinhardtii* (DOE Joint Genome Institute, Referenzstamm CC-503 cw92 (mt+); DDBJ/EMBL/GeneBank accession number: ABCN00000000 [Merchant et al., 2007]) nutzte man neben dem Sequenzvergleich und der Suche nach Sequenzhomologien [Merchant et al., 2007, siehe Tabelle 4ff] den Ansatz der Insertionsmutagenese, um die Funktion einzelner Loci zu studieren und eine indizierte Genomkarte zu entwickeln. Es entstanden Cosmid- [Purton und Rochaix, 1994], BAC- [Lefebvre und Silflow, 1999] und cDNA (*coding DNA*)- Bibliotheken [Asamizu et al., 1999] mit deren Hilfe verschiedene Komplementationsstudien ermöglicht wurden. Eine Übersicht aller online verfügbaren Datenbanken wurde publiziert [Blaby et al., 2014]. Die Stamm- und Plasmidsammlung beispielsweise, welche über das Chlamydomonas Resource Center (Link siehe Literaturverzeichnis) erreichbar ist, stellt eine umfangreiche Plattform dar, über welche Wissenschaftler einander Material zur Verfügung stellen. Die Gruppe um Niyogi (University of California-Berkeley) und Jonikas (Princeton University; *CLiP strains*)

beispielsweise stellen dort eine Reihe von Stämmen der Forschungswelt zur Verfügung, welche eben durch eine solche Mutagenese generiert wurden und, im Falle der Niyogi-Stämme, auf verschiedene Weisen Photosynthese-defizient sind [Dent et al., 2005]; [Dent et al., 2015]; [Zhang et al., 2014]; [Li et al., 2016]. Die Mutagenese erfolgte hierbei mittels linearisierter Plasmid-DNA, welche eine Zeozin- bzw. Paromomycin-Resistenz vermittelt. Ähnliche Ansätze wurden für *forward genetics* in Bezug auf den Stärkemetabolismus [Tunçay et al., 2013] und die Atmungskette [Barbieri et al., 2011] verfolgt. Im Zuge des *Chlamydomonas Genome Projects* konnten außerdem Erkenntnisse über *RNA silencing* Mechanismen gewonnen werden [Cerutti et al., 2011].

Möchte man die Mikroalge als Produktionsorganismus nutzen, so kann man sich der Methoden des *genome editings* sowohl im Plastom als auch im Karyom bedienen. Die Expression von Fremd-DNA ist im Chloroplasten vergleichsweise hoch. Im Review von [Gong et al., 2011] sind Ausbeuten von 0,25 – 5 % TSP (*total soluble protein*) in *C. reinhardtii* aufgeführt; Ausbeuten von max. 1 % TSP wurden hingegen bei Studien im Karyom beschrieben [Barahimipour et al., 2015]. Da das Plastom in bis zu 60 ringartigen Kopien organisiert ist, gestaltet sich das Erreichen des genetisch stabilen Zustandes unter Umständen schwierig. Der genetisch stabile Zustand des Plastoms wird als „Homoplasmie“ geschrieben, ein Zustand in dem alle ringartigen DNA-Strukturen die exakt gleiche Sequenz aufweisen. Nach der Transformation sind jedoch zunächst nur einige dieser DNA-Ringe verändert, sodass man ein geeignetes Selektionssystem benötigt, um zu einer Homogenität aller Sequenzen zu gelangen. Erreicht man die Homoplasmie trotz zeitaufwendiger Subkultivierungsversuche nicht, besteht die Gefahr, das Zielgen durch homologe Rekombinationen innerhalb des Chloroplasten wieder zu verlieren. Als Beispiel für die Anwendung einer phototrophen Selektion sei an dieser Stelle die Nutzung des Plasmidsystems pMM2 [Bertalan et al., 2015] genannt, welches auf den Arbeiten von [Bennoun et al., 1986] & [Minagawa und Crofts, 1994] basiert und den Rezipientenstamm CC-4147 FUD7 nutzt. Für pharmazeutische Anwendungen wurden im Chloroplasten von *C. reinhardtii* bereits Antikörper und Vakzine produziert. Beispiele dafür sind *large single chain* Antikörper gegen das Glycoprotein D des Herpes-simplex-Virus [Mayfield et al., 2003]; *heavy chain-only* Antikörper, welche das Botulinum Neurotoxin neutralisieren [Barrera et al., 2015] sowie die Bereitstellung des VP1-Proteins des Virus der Maul- und Klauenseuche [Sun et al., 2003] oder des E7-Proteins des humanen Papillomavirus [Demurtas et al., 2013], welche als Impfkandidaten in Frage kämen.

Die Nutzung des Karyoms in *C. reinhardtii* für *genome editing*-Anwendungen kann trotz der voraussichtlich weniger hohen Produktausbeuten durchaus attraktiv sein. Eine Integration des Zielgens im Karyom ist stabil und bedarf keiner wochen- bis monatelangen Subkultivierung unter Selektionsbedingungen. Beispiele für bereits gelungene Editierungen im Kerngenom

fangen mit ersten Erfolgen in der Expression fluoreszierender Fusionsproteine an. Dabei gelang eine GFP-Fusion am Augenfleck-lokalisieren Protein Opsin [Fuhrmann et al., 1999], auch gelang die Isolation des Terpens Patchouli im 50-mL-Maßstab mit einer Ausbeute von $1,03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in 7 d [Lauersen et al., 2016]. Auch Carotinoide konnten bereits kernkodiert produziert werden. Im 80-mL-airlift-Photobioreaktor gelang es $3,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Astraxanthin zu gewinnen [Perozeni et al., 2020]. Im Hinblick auf das weltweite Abfallproblem von Kunststoffen sind außerdem besonders interessant die Versuche zur Produktion von Enzymen, die in der Abfallwirtschaft eingesetzt werden können (PETase, iGEM-Projekt 2019 der Humboldt Universität sowie der TU Kaiserslautern, Link: siehe Literaturverzeichnis) Das Nutzen von Introns binnen der zu inserierenden Genkassette führte zur Steigerungen der Produktionsrate [Lumbreras et al., 1998]. Für all diese Versuche wurden Plasmide konstruiert, welche die funktionalen Kassetten codierten. Diese wurden linearisiert und während der Transformation ungerichtet im Karyom inseriert, der Insertionslokus blieb unbekannt.

Neben diesen ungerichteten Verfahren kommen auch immer mehr Methoden zum Einsatz, welche eine zielgerichtete bzw. ortsspezifische Mutagenese zulassen. Seit den 1990iger Jahren kommt die künstliche sequenzspezifische Zinkfinger-Nuklease [Kim et al., 1996] zum Einsatz, 2009 konnte die Tal-Effektor Domäne anhand des Effektorproteins AvrBs3 (*avirulenz protein bacterial spot 3*) bei *Xanthomonas* gefunden und für das *genetic engineering* nutzbar gemacht werden [Boch, 2011]. Diese Techniken wurden erfolgreich auf *C. reinhardtii* übertragen [Greiner et al., 2017]. Ziel ist hierbei an spezifischer Stelle im Genom einen DSB (Doppelstrangbruch) zu generieren, um dort entweder einen Funktionsverlust (*knock out*) zu erzeugen oder die zelleigenen Reparaturmechanismen (Kapitel 1.1.3) für den Einbau einer gewünschten Sequenz zu nutzen. Die Schwierigkeit bei diesen Techniken ist das Design und die Gewinnung der Lokus-spezifischen Nuklease. Mit der Entdeckung der CRISPR/Cas-Maschinerie (Kapitel 1.1.4.2) konnte dies Überwunden werden, da die Nutzung der Cas für jeden targetierten Lokus im Genom genutzt werden kann, lediglich die gRNA muss entsprechend designt sein. Unter dem Begriff „*Genome Editing*“ sind all diese molekularbiologischen Techniken zusammengefasst, bei denen eine artifizielle Endonuklease (TALENs, Zinkfinger, CRISPR/Cas) zum Einfügen einer zielgerichteten Veränderung im Genom genutzt wird.

1.1.4.2 Ein historischer Abriss: das CRISPR/Cas-System

Als Teil des adaptiven Immunsystems in Archeen und Bakterien wurde CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated endonuclease*) entdeckt [Bhaya et al., 2011] und dessen Möglichkeit als Werkzeug in der Genetik erkannt. Für die Entwicklung von Methoden zur Erbgutveränderung wurde 2020 der Nobelpreis für

Chemie an die Wissenschaftlerinnen Emmanuelle Charpentier (Frankreich) und Jennifer Doudna (USA) verliehen. 5 Jahre zuvor ging der Nobelpreis für Chemie an Tomas Lindahl (Schweden), Paul Modrich (USA) und Aziz Sancar (Türkei/USA) für Untersuchungen zu Reparaturmechanismen der Zellen im Falle einer DNA-Schädigung. Die dabei produzierten Untersuchungsergebnisse bilden die Grundlage für die Nutzung der Genschere CRISPR/Cas.

Das CRISPR-System umfasst DNA *repeat arrays* in intergenischen Regionen. Diese *arrays* wurden erstmals 1987 in *E. coli* beschrieben [Ishino et al., 1987]. Die Interpretation der Ergebnisse war jedoch durch die zu dieser Zeit limitierten Kenntnissen von viralen und plasmidären Sequenzen deutlich erschwert. Durch die Fortschritte in der Bioinformatik wurde es später möglich, diese *arrays* zu untersuchen. Es gab erste Prognosen, welche auf eine Beteiligung an der Chromosomenaufteilung und Gentransfer hindeuteten [Hermans et al., 1991; Mojica et al., 1995; Nelson et al., 1999]. 2002 wurde dann das Akronym „CRISPR“ das erste Mal verwendet [Jansen et al., 2002]. Das Jahr 2005 markierte einen Wendepunkt. Mehrere Gruppen publizierten unabhängig voneinander über *hypervariable spacers*, welche eine Sequenzhomologie zu Virus- bzw. Phagen-DNA/RNA aufwiesen. Untersucht wurden dafür Stämme von *Streptococcus thermophilus* & *vestibularis* [Bolotin et al., 2005], die prokaryotischen Systeme von Crenarchaeota & Euryarchaeota, sowie diverse Gram-negative und -positive Stämme [Mojica et al., 2005]. Auch das Pathogen *Yersinia pestis* wurde untersucht [Pourcel et al., 2005]. Es wurde die Rolle des CRISPR/Cas-Systems als putativer Teil des Immunsystems publiziert [Makarova et al., 2006]. 2012 publizierten die oben bereits erwähnten Nobelpreisträgerinnen E. Charpentier & J. Doudna die Möglichkeit der Nutzung dieses Systems als Werkzeug für die Gentechnik. Der Nobelpreisanwärter Feng Zhang entwickelte in Folge eine Vielzahl an Methoden für die Anwendung dieses Werkzeuges in humanen und tierischen Zelllinien (Zhangs *Lab web tool*, Link siehe Literaturverzeichnis), wobei 2013 seine ersten Arbeiten dazu publiziert wurden [Cong et al., 2013].

Auf die Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems in der Natur folgte eine breite öffentliche Resonanz, welche die Nutzung dessen als neue Technologie betraf. Im Sommer 2018 fällt der europäische Gerichtshof das Urteil, dass Pflanzen, welche durch *Genome Editing*-Verfahren (z. B. CRISPR/Cas) erzeugt wurden, als GMO einzuordnen sind.

1.1.4.3 Die Funktionsweise des CRISPR/Cas-Systems

Bevor die CRISPR/Cas-Maschinerie entdeckt und als *tool* anwendbar wurde, bediente man sich für gerichtete Insertionen anderer Nukleasen, der TALENs (*transcription activator-like effector nuclease*) oder Zinkfinger-Nukleasen. Um TALENs zu nutzen, ist es unabdingbar, für jeden Ziel-Lokus eine spezifische *Tal effector*-Domäne zu designen, zu synthetisieren und mit der Endonukleasedomäne zu verbinden [Boch, 2011]. Ähnliches gilt für die Zinkfinger-

dissoziiert, woraufhin die zelleigene Reparaturmaschinerie, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, in Gang gesetzt wird.

Es gibt verschiedene Wege, auf welchem die Cas-Nuklease und die entsprechende sgRNA in den Zellkern gelangen. Man kann dafür (1) beide Komponenten auf Vektoren codiert, (2) als fertiger RNP-Komplex oder (3) als mRNA/sgRNA-Mix der zu transformierenden Zellsuspension zugeben. Dies ist in Abbildung 1.1.4.3-2 visualisiert.

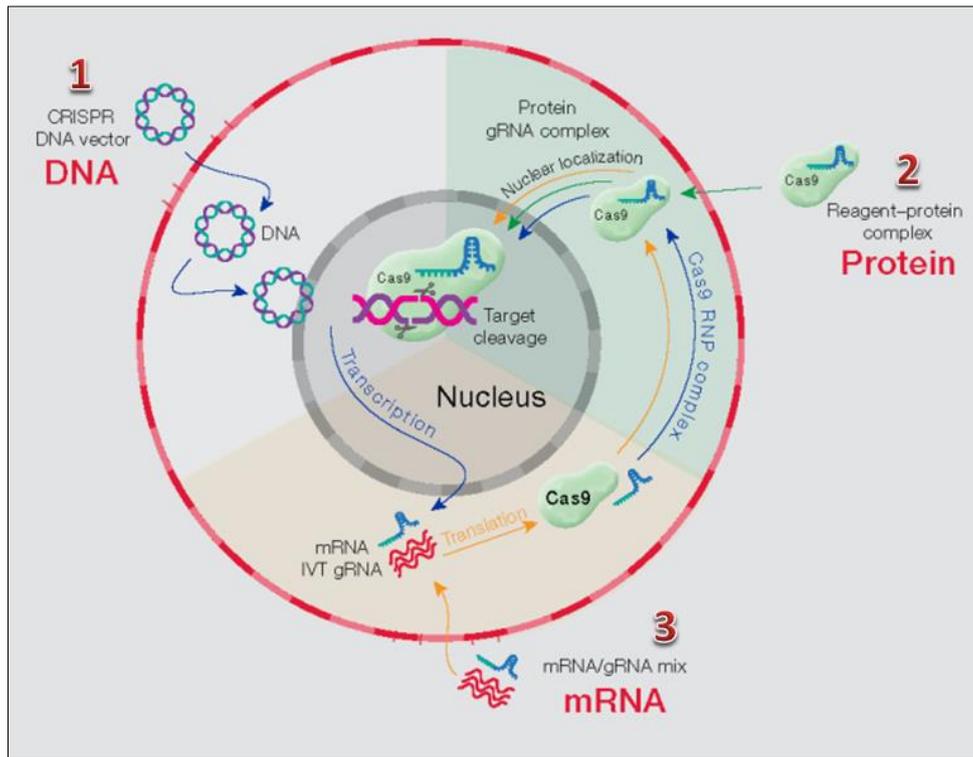


Abbildung 1.1.4.3-2: Darstellung verschiedener Ansätze, um die Cas-Nuklease und die entsprechende sgRNA in die Zelle zu bringen; die Abbildung wurde eine, Workshop der Firma ThermoScientific entnommen. Die Nummerierung ist für die Angaben in Tabelle 1.1.4.4-1 von Bedeutung.

Abkürzungen: Cas: CRISPR-associated protein; gRNA: guiding RNA (auch als sgRNA bezeichnet); mRNA: messenger RNA; IVT: in vitro transcription.

1.1.4.4 Anwendungen des CRISPR/Cas-Systems

Die Anwendungen des CRISPR/Cas-Systems sind vielfältig, sie reichen von *knock outs* für Gen-Funktionsstudien über *knock ins* für die Generierung von Fluoreszenz-Fusionsproteinen oder die Einführung von sog. *floxed sites* sowie Punktmutationen. Das Anwendungsspektrum wird außerdem durch inaktive, sog. *dead Cas* (*dCas*), erweitert. Diese kann als molekularer Schalter genutzt oder, mit einem Fluoreszenzlabel markiert, auch Genabschnitte markieren (*tagging*).

Tabelle 1.1.4.4-1 zeigt eine beispielhafte Auswahl über die bisherigen Anwendungen der CRISPR/Cas-Maschinerie, bei denen eine erfolgreiche Insertion von mindestens 5 Nukleotiden gelang. Die ausgewählten Beispiele zeigen, dass Insertionen von bis zu 7,5 Kilobasen im murinen und humanen Zellsystemen gelang, in *C. reinhardtii* dies so jedoch nicht publiziert werden konnte.

Die Nuklease Cas9 ist die am häufigsten genutzte Nuklease, weshalb sie in dieser Überblickstabelle die größte Rolle spielt. Es gibt jedoch neben der Cas9 (Typ II) weitere Nukleasen. Die Cas12a (Cpf1 oder C2c1, Typ V) beispielweise gewinnt an Bedeutung und auch die Cas13 (C2c2, Typ VI) wurde aus aktuellem Anlass als Alternative zur quantitativen PCR für die Detektion von SARS-CoV-2-RNA in der klinischen Phase erprobt [Patchung et al., 2020].

Tabelle 1.1.4.4-1: Übersicht einer Auswahl an bisherigen Anwendungen des CRISPR/Cas-Systems für den Organismus *C. reinhardtii* sowie für humane und murine Zellkultursysteme, die Nummern in Spalte „Cas-Protein“ stehen für eine der Varianten der Transformationsart (Abbildung 1.1.4.3.-2).

| Ziel | Organismus | Cas-Protein | Target Locus | Donor | Selektion | Referenz |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <i>fluorescent tagging</i> | HEK293T, UMUC3 & HeLa (human) | dCas9 (1), EGFP-tagged | <i>MUC4</i> | - | FACS | [Chen et al., 2013] |
| <i>knock in</i> | Maus, embryonale Stammzelllinie | Cas9 (3) | Multiple Loci, nicht näher definiert | Plasmid & ssDNA | Paro ^R | [Yang et al., 2014] |
| Transformation: Mikroinjektion Ziel: <i>Knock in of floxed sites</i> , GFP und Insertion von Punktmutationen Donor: pGFP-Paro ^R , ssDNA mit homologen Armen (40 – 60 nt) | | | | | | |
| <i>floxed</i> | Maus, embryonale Stammzelllinie & Zygoten | Cas9 (3) | <i>Lrba</i> | dsDNA, linear | Reporter | [Wang et al., 2015] |
| Cas-Protein <i>delivery</i> : Mikroinjektion Donor: 5,8 kb & 7,5 kb mit homologen Armen, codiert für einen Transkriptionsfaktor | | | | | | |
| <i>knock out</i> | <i>C. reinhardtii</i> | Cas9 (2) | <i>CpFTSY</i> & <i>ZEP</i> | - | phänotypisch | [Baek et al., 2016] |
| <i>knock out & knock in</i> | <i>C. reinhardtii</i> | Cas9 (2) | <i>MAA7</i> , <i>CpSRP43</i> & <i>ChIM</i> | Linearisierter Plasmid | Phänotypisch & Hygro ^R | [Shin et al., 2016] |
| Donor: pHygro, linearisiert; 1 µg (± 0,34 pmol) | | | | | | |
| <i>knock out</i> | <i>C. reinhardtii</i> | Cfp1 (2) | <i>FKB12</i> , <i>CpFTSY</i> , <i>CpSRP43</i> , <i>PHT7</i> | ssDNA, Stop-Kodone | Rap ^R | [Ferenczi et al., 2017] |
| Donor: 118 nt + á 45 bzw. 49 nt homologe Bereiche (5,26 nmol) | | | | | | |
| <i>knock out</i> | <i>C. reinhardtii</i> | Cas9 (1) | <i>PSY1</i> , <i>ChR2</i> , <i>COP1/2/5</i> & <i>PHOT</i> | Plasmid | <i>random insertion</i> : Pm ^R ; <i>Cas event</i> : phänotypisch/PCR | [Greiner et al., 2017] |
| Cas-Protein <i>delivery</i> : <i>random insertion</i> der kodierenden Sequenz für die dCas9 & die gRNA Donor: pParo, 1 - 2 µg (± 0,35 – 0,68 pmol) | | | | | | |
| Komplementation | <i>C. reinhardtii</i> | Cas9 (2) | GTS* des Rezipientenstammes | Plasmid | GTS*-Rezipientenstamm: | [Greiner et al., 2017] |

| | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| | | | | | Komplemen- tation | |
| Donor: pParo, 1 - 2 µg (± 0,35 – 0,68 pmol) | | | | | | |
| <i>knock out</i> | <i>C. reinhardtii</i> | Cas9 (2) | COP1/2 | Plasmid, dsDNA (ODN) | Pm ^R , PCR- <i>screening</i> | [Greiner et al., 2017] |
| Donor: pParo & FLAG (Stopp in mehreren <i>frames</i>), 30 nt Selektion: Test der Transformation an sich, nicht des Schnitt-Events | | | | | | |
| <i>trans- criptional silencing</i> | <i>C. reinhardtii</i> | dCas9 (1) | CrPEPC1 | Plasmid | Hygro ^R , PCR- <i>screening</i> | [Kao und Ng, 2017] |
| Ziel: <i>downregulation</i> of PEPC1, Lipid-Produktion steigern Cas-Protein <i>delivery</i> : <i>random insertion</i> der kodierenden Sequenz für die dCas9 & die gRNA Donor: pChlamy_3-RFP | | | | | | |
| <i>knock in, fluor- escent tagging</i> | HEK293T (human) | Cas9 (2) | RAB11A, CLTA & HIST2H2BE | Lange ssDNA | FACS | [Li et al., 2017] |
| Donor: 2 kb Fragment-länge, 20 pmol, mit homologen Armen | | | | | | |
| <i>knock in of floxed sites</i> | <i>mouse zygotes</i> | Cas9 (2), zwei sgRNAs pro Target | <i>Pitx, Ambra, Col12a1, Syt1, Syt9 & PPP2r2a</i> | Lange ssDNA | Reporter, Genotyping | [Quadros et al., 2017] |
| Donor: 1050 bp Fragmentlänge inkl. homologe Arme (ca. 60-105 bp), 5-10 ng/µL des Donors, kodiert für FlpO Recombinase, <i>reverse tetracycline transaktivator</i> oder Reporter (mCherry/mCitrine) | | | | | | |
| <i>In frame knock in of GFP</i> | <i>A. thaliana</i> | Cas9 (1) | ROS1 & DME | Plasmid | Basta ^R , Luc- Reporter, konfokale Mikroskopie | [Miki et al., 2018] |
| Cas-Protein <i>delivery</i> : Agrobacterium Donor: mit homologen Armen, codiert für Luc & GFP | | | | | | |
| <i>knock in of repeats</i> | HCT116 (mammalian) | Cas9 (1) | Multiple Loci, u.a. Hsp70 | Lineare dsDNA | TetR-EGFP- Expression | [Tasan et al., 2018] |
| Ziel: diese <i>repeats</i> können anschließend markiert werden, <i>live cell imaging, labeling</i> Donor: mit homologen Armen (50 nt), codiert für TetO-repeat, short homology arms; Länge insgesamt; 3,3 kb, 83 ng pro Ansatz | | | | | | |
| <i>knock in EGFP</i> | HEK293T & HCT116 (mammalian & human) | Cas9 & Cpf1 (2) | Multiple Loci, u.a. <i>GAPDH</i> , & Hetero- chromatin- regionen | Linear dsDNA | FACS | [Yu et al., 2020] |
| Donor: 0,7 bzw. 2,5 kb mit homologen Armen (50 bp); codiert für EGFP | | | | | | |

Erklärungen zu den von diesen Loci kodierten Proteinen: MUC4: Glycoprotein, beteiligt am Schutz der Schleimschicht diverser Epithel; FKB12: *FK506-binding protein 12*, vermittelt die Interaktion zwischen Rapamycin und dem Zellzyklus-Regulator; LrBa: *lipopolysaccharide-responsive vesicle trafficking, beach & anchor*; MAA7: β-Untereinheit der Tryptophan-Synthase; CpFTSY & CpSRP43: Bestandteile des Chloroplast-Signalerkennungspartikels, beteiligt bei der Assemblierung der Lichtsammelkomplexe; ZEP: Zeaxanthin Epoxidase, Carotinoidbiosynthese, beteiligt an der Anpassungsfähigkeit der Zelle an hoch- und niedrig-UV-Bedingungen; ChlM: Mg-Protoporphyrin IX S-Adenosyl-Methionine-O-Methyl-Transferase; PHT7: putativer Phosphat-Transporter; PSY1: Phytoene-Synthase-1, beteiligt an der Carotinoid-Biosynthese; COP: Photorezeptorgene, codieren für Channelrhodopsine; PHOT: Phototropin; CrPEPC1: Proteine, welche an der Regulierung des *carbon flux* in den TCA-Zyklus beteiligt sind; RAB11A: gehört zur GTase Superfamilie; CLTA: *clathrin light chain A*; HIST2H2BE: Histon; Ambra: Tumorsuppressor; Col12a1: Kollagen Typ XII alpha 1; Syt: Synaptotamin; PPP2r2a: Protein-Phosphatase 2 regulatorischen Untereinheit 2a; ROS1 & DME: an der Glycosylase beteiligt

Wie Tabelle 1.1.4.4-1 zu entnehmen ist, wurden kurze Donore für *knock out* Studien und längere Fragmente für Insertionen genutzt. In der Mikroalge *C. reinhardtii* wurden beispielsweise Donore einer Länge von 30 Nukleotide [Greiner et al., 2017] oder 160 Nukleotide [Ferenczi et al., 2017], auf welchen mehrere Stop-Kodone in verschiedenen *frames*

codiert waren, genutzt. So sollte ein *knock out* garantiert werden. Im Maussystem wurden kurze Donore von 40 – 60 Nukleotide verwendet, um *floxed sites* einzufügen, die in weiteren Experimenten zu einer Inversion oder Exzision der zwischen den *sites* gelegenen DNA-Abschnitte genutzt werden können [Yang et al., 2014]. *Off-targets* konnten in dieser Arbeit nicht detektiert werden. Bei *knock out* Studien wurde keine Donor-DNA angeboten, jedoch zu Selektionszwecken ein Plasmid zur Resistenzvermittlung co-transformiert [Shin et al., 2016]. Interessanterweise wurden Teile dieses Vektors an der Cas-Schnittstelle gefunden, *Off-targets* konnten nicht detektiert werden.

Die Verwendung längerer Donore erlaubte die Insertion von Genen, die für fluoreszierende Reporterproteine kodieren. Dabei wurde doppelsträngige DNA mit homologen Armen verwendet. [Yu et al., 2020]. 3,3 kb bzw. 2,5 kb kamen hier als Donore zum Einsatz. Andere nutzte doppelsträngige, linearisierte DNA einer Länge von 5,8 und 7,5 kb zur Insertion einer TCLC (*transcription control and labeling cassette*) im murinen Zellkultursystem, wobei 70% aller CRISPR-Klone korrekt im Genom targetiert waren [Wang et al., 2015].

Der technische Fortschritt macht es mittlerweile möglich auch lange einzelsträngige DNA zu generieren. Die Nutzung dieser als Donore wurde publiziert, wobei, 2 Kilobasen inkl. homologer Bereiche in der humanen Zelllinie HEK293T zum Zwecke des *fluorescent targeting* eingefügt wurden [Li et al., 2017b]. Auch wurde die Verwendung eines einzelsträngigen Fragments von 1050 Nukleotiden publiziert [Quadros et al. 2017], welches für die Insertion eines Reporters in Mauszygoten führte; eine Prüfung möglicher *Off-targets* fand nicht statt. Da mittlerweile einzelsträngige DNA-Fragmente auch konventionell erwerbbar sind, rückt dessen Anwendung als Donor mehr und mehr in den Fokus.

1.1.5 Der SNF1-related protein kinase 2.2 - Lokus

In der vorliegenden Arbeit wurde der *SNRK2.2*-Lokus für den Cas9-getriebenen Doppelstrangbruch (DSB) targetiert. SNRK steht dabei für SNF1 - related protein kinase 2.2, SNF1 wiederum ist die Sucrose non-fermenting protein kinase 1. Dieser Lokus wurde gewählt, da dessen Mutation zu einer unkontrollierten Produktion eines Enzyms (ARS, Arylsulfatase) führt, dessen Anwesenheit mit einem Farbttest (siehe Kapitel 2.2.8 im Material- und Methodenteil) sichtbar gemacht werden kann. Somit wird ein *screening* ermöglicht.

C. reinhardtii ist in der Lage auf Sulfatmangel zu reagieren. Die Konzentration an SO_4^{2-} -Ionen im TAP-Medium beträgt 0,51 mM ([Harris (Hrsg.), 2009, „Chlamydomonas Sourcebook“ Vol. 1, S. 243], Verlust an Stoffmenge durch das Präzipitat bei der Präparation der Hutner-Lösung).

Ist die Konzentration des Makronährstoffs Sulfat im Medium/Habitat gering (Sulfatmangelstudien im Bereich von 0 - 250 μM [Yildiz et al., 1994]), muss gebundenes Sulfat aktiv aus dem Extrazellularraum gelöst und in die Zelle transportiert werden. Um SO_4^{2-} -Ionen zu gewinnen, produziert *C. reinhardtii* in dieser Mangelsituation ein Enzym, die Arylsulfatase (ARS). Diese wird in den Extrazellularraum abgegeben. ARS ist ein periplasmatisches Enzym, welches Sulfat von aromatischen Verbindungen abspalten kann. Die so frei gewordenen SO_4^{2-} -Ionen können daraufhin aktiv in die Zelle transportiert werden. Daran beteiligt sind das integrale Membranprotein Sac1 [Davies et al., 1996] sowie der Sulfat-Transporter, welche von *Sultr2*, *Slt1* & *SltT2* kodiert werden [Pootakham et al., 2010]. Die Transkription der für die ARS kodierenden Sequenzabschnitte wird durch einen Transkriptionsfaktor (in Abbildung 1.1.5-1 als „TF“ bezeichnet) reguliert. Ist dieser phosphoryliert kommt es zur Initiation der Transkription und folgend zur Produktion der ARS. Die Phosphorylierung des TF geschieht durch die Serin/Threonin Kinase SNRK2.1 (*Snf1-related protein kinase*, Snf1: *S*ucrose *n*on-fermenting *p*rotein *k*inase 1). Deren Gegenspieler, die Kinase SNRK2.2 (Uniprot-Eintrag: Q9ZSM9, codiert im Genom von *C. reinhardtii* auf Chromosom 12), inhibiert die SNRK2.1. Ist die SNRK2.2 jedoch mutiert, kommt es zur Phosphorylierung des TF durch die SNRK2.1. Man spricht deshalb von der SNRK2.2 auch als Negativregulator für die Induktion der ARS und ein Positivregulator des Importsystems von extrazellulärem Sulfat [Davies et al., 1999]. In Abbildung 1.1.5-1 ist die Regulation schematisch dargestellt.

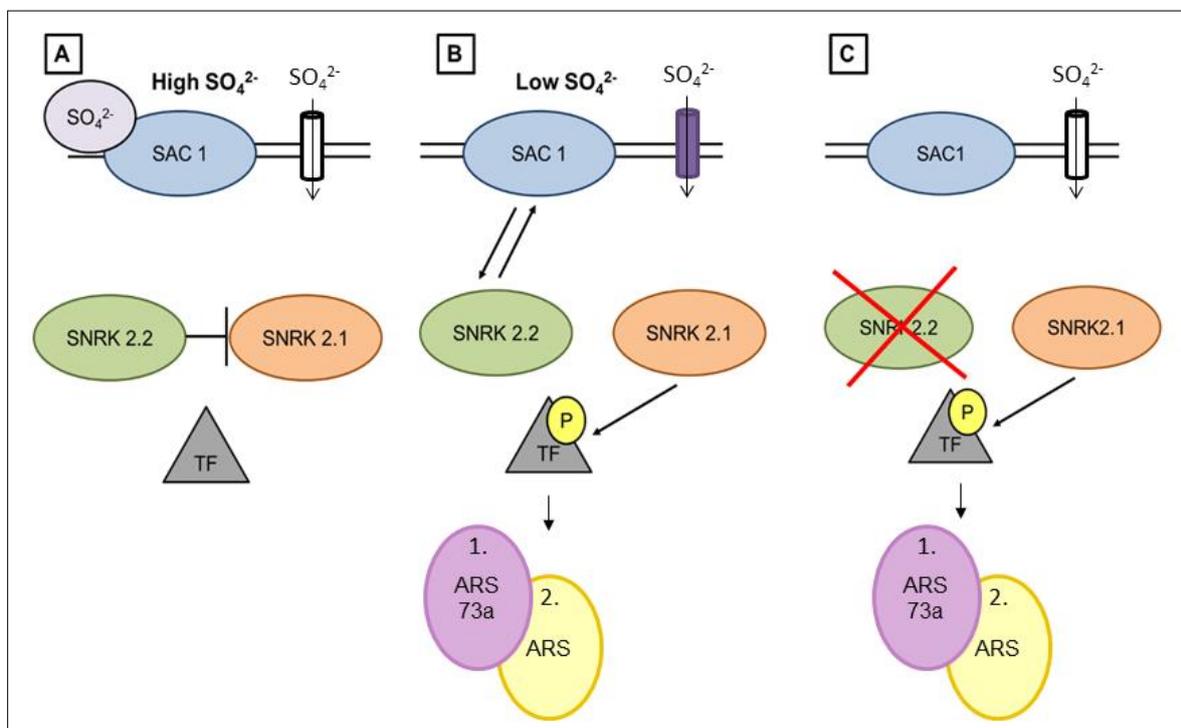


Abbildung 1.1.5-1: Vereinfachte Darstellung des Modells, welches die regulatorischen Vorgänge im Zusammenhang mit der Akklimation von *C. reinhardtii*-Zellen an Sulfatmangel darstellt. A: Herrscht

ein Überangebot an freien Sulfat-Ionen im extrazellulären Raum, wird dies durch Bindung an das integrale Membranprotein SAC1 (*Sulfur acclimation 1 protein*, Uniprot-Eintrag: A8J7D0) detektiert. Dadurch wird SAC1 von nachgeschalteten regulatorischen Vorgängen abgekoppelt. Das zytosolische SNRK2.2 (veraltet: SAC3) unterdrückt die Transkription der bei Sulfatmangel aktiven Gene, möglicherweise durch Hemmung der Aktivität des positiven regulatorischen Faktors SNRK2.1 (z. B. durch Phosphorylierung von SNRK2.1). Diese Wechselwirkung sorgt dafür, dass die bei Sulfatmangel aktiven Gene nur wenig oder gar nicht exprimiert werden. B: Unter Sulfatmangelbedingungen ist SAC1 frei von gebundenem SO_4^{2-} , wodurch es mit dem zytosolischen SNRK2.2 interagieren kann (hypothetisch). Diese Interaktion verhindert die Hemmung von SNRK2.1, das dann aktiv werden und einen nachgeschalteten Transkriptionsfaktor phosphorylieren kann (bezeichnet als TF; nicht näher beschrieben). Die Akklimatisierung von *C. reinhardtii* führt über eine zweistufige Genaktivierung, die Phosphorylierung des TFs führt zur Aktivierung von Genen der ersten Stufe. SNRK2.2 leitet die daraufhin produzierten SO_4^{2-} -Transporter zur Plasmamembran, welche dort in die Membran integriert und dort stabilisiert werden (visualisiert als lilafarbene Röhre). Ein Produkt der ersten Stufe der Genaktivierung ist das ARS73a-Protein. Es wird unter diesen Bedingungen in hohen Mengen synthetisiert und ist an der Transkription von Genen der zweiten Stufe beteiligt. Ein Produkt der Aktivierung von Genen der zweiten Stufe ist ARS (Arylsulfatase), das in den extrazellulären Raum sezerniert wird, um dort gebundenes Sulfat hydrolysiert. Über die Importer wird das Sulfat dann in die Zellen transportiert C: Ist der Regulator SNRK2.2 durch z.B. eine *knock out* Mutation ausgeschaltet, herrschen dem Sulfatmangel ähnliche Bedingungen in der Zelle, unabhängig von der tatsächlichen SO_4^{2-} -Ionenkonzentration im extrazellulären Raum. Der Regulator SNRK2.1 ist frei und kann die entsprechenden TFs phosphorylieren, in Folge dessen ARS73a und ARS produziert werden. Die Abbildung und Bildunterschrift sind angelehnt an die Publikation [Aksoy et al., 2013].

Der in dieser Arbeit angewandte Farbttest zum *screening* von Mutanten, welche einen DSB (Doppelstrangbruch) im *SNRK2.2*-Lokus aufweisen, beruht auf der Sekretion der ARS in den extrazellulären Raum (Abbildung 1.1.5-1 C). Wird den Mutanten das Substrat XSO_4 angeboten, wird dieses durch die ARS zu einem Indigoderivat hydrolysiert, welches als blauer Hof um eine Kolonie auf der Agarplatte oder als eine Blaufärbung des Mediums bei Flüssigkulturen erscheint. Der chemische Mechanismus dieser Reaktion ist in Abbildung 1.1.5-2 abgebildet. Dieser Farbttest wurde von [Davies et al., 1992] eingeführt.

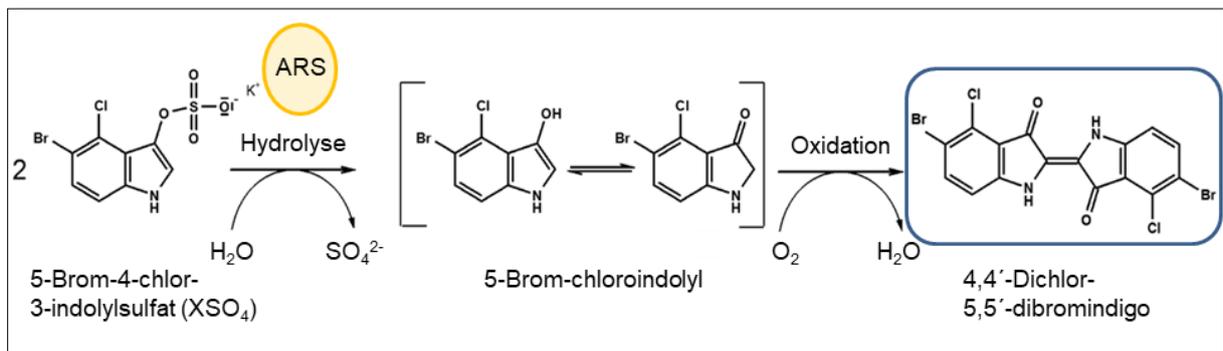


Abbildung 1.1.5-2: Reaktionsmechanismus der Farbreaktion in Gegenwart des Substrates XSO_4 über das 5-Brom-chloroindolyl zu 4,4'-Dichlor-5,5'-dibromindigo. Im ersten Schritt findet dabei eine Hydrolyse des Sulfations statt, wobei das Leukoindigoderivat 5-Brom-chloroindolyl entsteht. Diese Zwischenform liegt als Tautomer vor. Im zweiten Schritt verbinden sich zwei 5-Brom-chloroindolyl-Moleküle in einer Oxidationsreaktion unter Abspaltung von Wasser zu 4,4'-Dichlor-5,5'-dibromindigo, einem Indigoderivat, welches blau erscheint.

1.1.6 Funktionsweise der Aminoglycosid-3-phosphotransferase

Die Resistenz-vermittelnde Genkassette, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, codiert für das Enzym AphVIII, der Aminoglycosid-3-phosphotransferase aus *Streptomyces rimosus* [Sizova et al., 1996]. Es katalysiert den regiospezifischen Transfer eines γ -Phosphates von einem ATP zu einer Aminoglycosid-Hydroxylgruppe von z. B. Paromomycin [[Thompson et al., 1996]. Durch diese Phosphorylierung wird das Aminoglykosid-Antibiotikum in seiner Wirkung inhibiert, eine Resistenz ist ausgebildet.

Paromomycin gehört, ebenso wie z. B. Streptomycin, Neomycin oder Kanamycin, zur Stoffgruppe der Aminoglycoside. Es wird unter dem Handelsnamen Humatin in der Humantherapie vertrieben und bei Infektionen im Verdauungstrakt oder bei Leishmanose verabreicht. Es wirkt auf Prokaryoten und auf Eukaryoten, wobei es die Translation inhibiert. Durch Bindung in die Bindetasche der 16- bzw. 18S-rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit kommt es zu *misreading*-Ereignissen, eine korrekte Proteinbiosynthese wird unmöglich (PDB 1FYP, Komplex aus der eukaryotischer 18S-rRNA und Paromomycin [Lynch und Puglisi, 2001]). Eine Inhibierung der Translationsmaschinerie im Chloroplasten von *Chlamydomoans reinhardtii* beispielsweise wirkt sich so aus, dass es zu einem Verlust an für die Photosynthese relevanten Pigmenten kommt. Die Thylakoide zeigen eine anormale Stapelbildung nach Antibiotika-Zugabe [Arnold, 1974].

1.1.7 Bewertung des Erfolgs der Genom Editierung

In der Literatur sind viele Begrifflichkeiten zu finden, die den Erfolg einer Transformation quantitativ zu beschreiben versuchen. Dabei wurde die Anzahl an Transformanten mit verschiedenen Bezugsgrößen verrechnet. Angefangen von der einfachen Einbeziehung aller im Transformationsansatz eingesetzten Zellen über die Überlegung, nur jene Zellen zu verrechnen, die nach dem Transformationsereignis überhaupt lebensfähig sind bis hin zum Ansatz, nur die Anzahl an jenen Zellen einzubeziehen, die einer Vorselektion standhalten, wurden publiziert.

Die Selektionsfrequenz [Greiner et al., 2017; Shin et al., 2016] stellt die Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten (KBEs) dar, welche nach der Transformation auf Selektionsmedium wachsen. Als Bezug wird hierbei die Gesamt-Zellzahl gewählt, die im Transformationsansatz eingesetzt wurde. Hierbei spielt eine Mutation am targetierten Locus keine Rolle. Es wird lediglich betrachtet, ob eine Mutation stattfand. Die Selektionsfrequenz zeigt an, mit welcher Häufigkeit sich eine Mutation ereignete, die das Wachstum auf Selektionsmedium ermöglicht.

Beim Begriff der Selektionseffizienz geht man einen Schritt weiter und betrachtet die Anzahl an Zielkolonien [Ferenczi et al., 2017]. Als Zielkolonie werden all jene KBEs nach der Transformation angesehen, die eine Mutation am targetierten Lokus tragen. Als Bezugsgröße dient hier die Anzahl jener KBE, welche auf Medium ohne Selektionsmarker wachsen. Der Quotient beider Größen multipliziert mit 100 ergibt die Selektionseffizienz. Dieser Begriff stellt also ebenfalls dar, mit welcher Häufigkeit eine Mutation stattfindet. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Selektionsfrequenz ist hier jedoch die Mutation am targetierten Lokus entscheidend.

Zusätzlich zu den beiden oben beschriebenen Werten, wird in der Literatur außerdem der Begriff der Targeteffizienz genutzt („*targeting efficiency*“, [Baek et al., 2016; Greiner et al., 2017]). Ebenso wie die Selektionseffizienz, zeigt auch dieser Wert die Häufigkeit an, mit der der targetierte Lokus der zu transformierenden Zellsuspension durch die Cas9 mutiert wurde. Geteilt wird diese Anzahl durch die Menge an Kolonien, welche auf Selektionsmarker („*selected colonies*“) wuchsen. Die Vorselektion spielt hier demnach eine Rolle.

1.2 Zielsetzung und Motivation

Die Nutzung von Mikroorganismen und Enzymen spielen in der Historie des Menschen eine große Rolle. Angefangen von der Nutzung von zunächst tierischem Lab bei der Käseherstellung bis hin zur Methode des Bierbrauens erhielten Mikroorganismen Einzug in die ökonomische Entwicklung des Menschen und dessen Nahrungsmittelkultur. In der modernen Welt erweiterte sich die Nutzung auf den pharmazeutischen Bereich und durch die Werkzeuge der Molekularbiologie ist heute *metabolic engineering* möglich. Dies führte zu ökonomischen Verfahren, Produktionsorganismen wurden und werden entworfen. Die biotechnologische Produktion von Wertstoffen mittels Bakterien und Hefe erfordert die Bereitstellung von Kohlenstoffquellen, meist in Form von Kohlenhydraten. Diese werden aus Pflanzen gewonnen, die für die Synthese Kohlenstoffdioxid und Sonnenlicht verwenden. Um eine direkte biotechnologische Synthese von Wertstoffen aus CO₂ zu erreichen, ist die genetische Modifikation phototropher Mikroorganismen erforderlich. Da CO₂ ein Treibhausgas ist, wäre die Nutzung phototropher Organismen besonders zukunftssträftig.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit grundlegenden Untersuchungen zur Etablierung von Methoden zur gezielten genetischen Modifikation der Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) mittels CRISPR/Cas. Das CRISPR/Cas-System stellt eine echte Alternative zu den herkömmlichen Methoden der *toolbox* der Genetik dar. Für diese Methode ist es, im Gegensatz zu den klassischen Methoden, möglich, wildtypische Stämme zu

modifizieren. Die Erzeugung eines Rezipientenstamms ist hierbei nicht notwendig. Außerdem ist es nicht nötig, für jeden targetierten Locus eine spezielle Nuklease zu designen, zu produzieren und aufzureinigen. Dieses zeitaufwendige Prozedere, welches mit TALENs und Zink-Finger-Nukleasen notwendig war, wurde durch die neue Technik revolutioniert. Für alle Targets kann die gleiche Nuklease verwendet werden, lediglich die kurze gRNA muss dem zu mutierenden Locus angepasst werden.

Zunächst sollte der *knock out* eines genomischen Loci etabliert werden. Darauf aufbauend sollten Versuche für ein *knock in* erfolgen. Außerdem war ein Selektionssystem auszuwählen und zu etablieren. Die Analyse der Insertionen am targetierten Gen-Lokus erfolgte mittels Sequenzierung, die Identifizierung möglicher Mehrfachinsertionen erfolgte mittels Southern Blot. Bisher publizierte Insertionserfolge, welche mit Generierung eines Zielproduktes einhergehen, beruhen in *C. reinhardtii* bisher auf ungerichteten Insertionsmethoden. Im Gegensatz dazu sollte in der vorliegenden Arbeit der Insertionsloкус bekannt sein und gezielt verändert werden. Soll ein Produktionsorganismus auf dem Markt eingeführt werden, müssen Informationen über den Ort der genetischen Veränderung eines Produktionsorganismus bekannt sein und behördlich erfasst werden. Ein Ansatz über einen ungerichteten Ansatz kam deshalb nicht in Frage. Um einen gezielten Locus zu adressieren, ist die Nutzung einer Nuklease, in diesem Fall der Cas9, gewählt worden. Dadurch werden die zelleigenen Reparaturmechanismen angeschaltet und die im Transformationsansatz zugegebene artifizielle DNA kann als Reparatur-Donor-DNA (Donor) verwendet werden.

Die Motivation dieser Arbeit bestand darin, der spannenden Frage nachzugehen, wie der DNA-Reparatur-Donor geartet sein muss, damit eine möglichst präzise, vollständige und effiziente Insertion gelingt. Das Anwendungsspektrum der CRISPR/Cas-Maschinerie sollte erweitert werden. Es stand nicht der *knock out* im Fokus, vielmehr sollte die Insertion einer funktionaler Genkassette in *C. reinhardtii* erzielt werden (Länge der für Paromomycin codierenden Sequenz: ca. 2000 bp). Die Donore sollten linear (einzeln- oder doppelsträngig) sowie zirkuläre (plasmidär, doppelsträngig) vorliegen, mit und ohne homologe Arme designt sein. Im Falle des zirkulären Donors sollte außerdem der Einfluss einer *codon usage* Optimierung der Zielsequenz in *C. reinhardtii* untersucht werden. Es schlossen sich Untersuchungen zu Einfach- bzw. Mehrfachinsertionen bei den einzelnen Ansätzen an.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in Tabelle 2.1.1-1 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tabelle 2.1.1-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

| Bezeichnung | Lieferant | Bestellnummer | Reinheit, Bemerkungen zur Lagerung |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------|
| Aceton ROTISOLV® | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 7328.2 | HPLC Gradient Grade, RT |
| Agar-Agar | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 5210.2 | k. A., RT |
| Ammoniumacetat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | T872.2 | ≥96 %, reinst, RT |
| Ammoniumchlorid | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 5470.1 | ≥ 99 %, RT |
| Ammoniummolybdat Tetrahydrat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 3666.1 | ≥ 99 %, p. a., RT |
| Ampicillin Natriumsalz | AppliChem, Chicago, USA | A6352 | Ph. Eur., pure, Pharma Grade, 4 °C, lichtgeschützt |
| Borsäure | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | P010.1 | ≥ 99,5 % Ph. Eur., USP, BP, RT |
| 5-Brom-4-chlor-3-indolylsulfat (XPO ₄ oder BCIP) Kaliumsalz (chromogenes Substrat für den Southern Blot) | AppliChem, Chicago, USA | A1117 | 98 % HPLC, -20 °C, lichtgeschützt |
| 5-Brom-4-chlor-3-indolylsulfat (XSO ₄) Kaliumsalz (chromogenes Substrat für Sulfatasen) | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA | B1379 | k. A., -20 °C, lichtgeschützt |
| Calciumchlorid Dihydrat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 5239.2 | ≥ 99 %, p. a., ACS, RT |
| Glycerin ROTIPURAN® | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 3783.2 | ≥ 99,5 %, p. a., wasserfrei, RT |
| Eisen(II)-sulfat Heptahydrat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 3722.1 | ≥ 99,5 %, Ph. Eur., USP, RT |

| | | | |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------|
| Essigsäure | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 6755.1 | 100 % Ph. Eur., reinst, RT |
| Ethanol ROTISOLV® | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | P076.2 | HPLC Gradient Grade, RT |
| Ethidumbromidlösung (10 mg · mL ⁻¹ , gelöst in Wasser) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 2218.1 | k. A., 4 °C, lichtgeschützt |
| Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 8043.3 | ≥ 99 %, p. a., ACS, 4 °C |
| Kaliumhydroxid | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 6751.1 | ≥ 85 %, p. a., in Plätzchen, RT |
| di-Kaliumhydrogenphosphat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | P749.3 | ≥ 99 %, Ph. Eur., BP, wasserfrei, RT |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | P018.1 | ≥ 98 %, Ph. Eur., BP, wasserfrei, RT |
| Kanamycinsulfat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | T832.3 | ≥ 750 I. U. · mg ⁻¹ , 4 °C, lichtgeschützt |
| Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | T889.1 | ≥ 99 %, p. a., ACS, ISO, RT |
| Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | P024.1 | ≥ 99 %, p. a., ACS, ISO, RT |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | P027.2 | ≥ 90 %, p. a., ACS, RT |
| Maleinsäure | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | K304.2 | ≥99 %, Ph. Eur., BP, RT |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | T881.1 | ≥ 90 %, p. a., RT |
| Natriumacetat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 6773.1 | ≥ 99 %, p. a., ACS, wasserfrei, RT |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | P029.3 | ≥ 99 %, p. a., USP, RT |
| Natriumdodecylsulfat (SDS, 20 % Roti-Stock) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 1057.1 | k. A., RT |
| Natriumhydroxid | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | P031.2 | ≥98 %, Ph. Eur., USP, BP, in Plätzchen, RT |
| Nitro Blue Tetrazolium Chlorid (NBT) | AppliChem, Chicago, USA | A1243 | 99 %, -20 °C, lichtgeschützt |

| | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------|-----------------------------------|
| N-Lauroylsarcosin Natriumsalzlösung (Sarcosyl, 20 %) | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland | L7414 | k. A., RT, lichtgeschützt |
| Nuklease-freies Wasser | New England Biolabs, Ipswich, USA | B1500L | Nukleasefrei, RT |
| Orange G | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 0318.1 | k. A., RT, lichtgeschützt |
| Paromomycinsulfat | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland | 512731-5GM | ≥ 98 % (DC), 4 °C, lichtgeschützt |
| Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1), stabilisiert, gesättigt mit Tris-EDTA | Acros Organics, Fair Lawn, USA | 10535691 | Nuklease- und Proteasefrei, 4 °C |
| Salzlösung Natriumcitrat (SSC), 20fach konz., pH 7,0 | AppliChem, Chicago, USA | A1396 | DEPC treated, RT |
| Salzsäure | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 7476.1 | 37 %ig, rauchend, technisch |
| Sucrose (D(+)-Saccharose) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 4621.1 | ≥ 99,5 %, p. a., RT |
| TBE-Puffer, 10x, ROTIPHORESE® | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 3061.2 | k. A.; RT |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS PUFFERAN®) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 4855.2 | ≥ 99,5 %, p. a., RT |
| Tween®20 (Polyoxyethylen-20-sorbitanmonooleat) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | 9127.2 | Ph. Eur., RT |
| Zinksulfat Heptahydrat | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland | K301.1 | ≥ 99,5 %, p. a., ACS, RT |

2.1.2 Geräte und zusätzliche Materialien

Sämtliche verwendete Geräte und zusätzliche Materialien sind in der Tabelle 2.1.2-1 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tabelle 2.1.2-1: Übersicht über die verwendeten Geräte und zusätzlichen Materialien.

| Gerät | Typ | Hersteller |
|-------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Agarosegellaufapparatur | MßP™ Horizontal Midi-Gel System, 8200 Series | Molecular Bio-Products, inc., San Diego, USA |
| Autoklav | Systec V-Serie | Systec GmbH, Linden, Deutschland |
| Elektroporator NEPA21 | mit Küvettenhalterung | NEPAGENE, Japan; vertreten durch Xceltis, Mannheim, Deutschland |
| Flowbox | Nu-440-400 | NuAire Inc., Plymouth, USA |

| | | |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Geldokumentation | Syngene G:Box; Software: GeneTools analysis | Syngene, Maryland, USA |
| Heizplatte mit Magnetrührer | MR 3001 | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| Klimaschrank | RUMED, Typ: 1200, Nummer: 71898; programmierbare Tages- und Nachtzyklen; integrierte Leuchtstoffröhren mit Warmweißspektrum und 2,2 kW, 220 V, 10 A, 50 Hz | Rubarth Apparate GmbH, Laatzen, Deutschland |
| Lichtmessgerät | LI-1400 data LOGGER, Sensor Quantum Q48557 | Li-cor Biociences, Lincoln, USA Temporäre Leihe aus der ehem. AG Johanningmeier |
| NanoDrop | NanoDrop One ^C Spektrophotometer | Thermo Scientific, Massachusetts, USA |
| pH-Meter | Five Easy | Mettler Toledo, Columbus, USA |
| Spektrometer | Helios Zeta | Thermo Scientific, Massachusetts, USA |
| Tischschüttler | Celltron, für das Betreiben in Klimaschränken geeignet | Infors HT, Bottmingen, Schweiz |
| Thermoblock & -mixer | Thermomixer comfort | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Thermocycler | TProfessional Gradient Cyler | Analytik Jena, Jena, Deutschland |
| UV-Crosslinker | CX-2000-Crosslinker | Analytik Jena, Jena, Deutschland |
| Vakuuierer | FS 3604 | Severin, Sundern, Deutschland |
| Vortexer | Vortexgenie 2, 5i | Scientific Industries, New York, USA |
| Waage | 572-371 | Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland |
| | Feinwaage APX-100 | Satorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Wasserbad | DC10 | Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland |
| Wippschüttler | 444-0341 | Grand Instruments Ltd., Cambridge, England |
| Zentrifuge | Tischzentrifuge 5415 R, mit Kühlfunktion | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| | 5810 R, mit Kühlfunktion | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Zentrifugationsverdampfer | SPEEDVAC, Concentrator 5301 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Zusätzliche Materialien | Typ, Bestellnummer | Hersteller |
| Elektroporationsküvetten | 2 mm gap, long electrodes; CAT: PEQL71-2020-LE | VWR, Deutschland |

| | | |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Filterpapier | Whatman™ Papier | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| Filterspitzen | PP, lose im Beutel, zum autoklavieren, CE-IVD; 0,1 - 10 µL: 732504 5 - 300 µL: 732512 200 - 1000 µL: 732514 | Brand GmbH & co KG, Wertheim, Deutschland |
| Freezing Container | „Mr. Frosti“, 5100-0001 | Thermo Scientific Nalgene, Massachusetts, USA |
| Mikrotiterplatten | 24-Well, Cellstar® Culture plate, steril, mit Deckel; REF: 662 102 | Greiner bio-one, Krems-münster, Österreich |
| | 96-Well, Microtest™ Flat Bottom, steril, mit Deckel; REF: 35 1172 | Falcon, Omnilab, Bremen, Deutschland |
| | 96-Well, V-bottom-plate, unsteril, ohne Deckel; REF: 651101 | Greiner bio-one, Krems-münster, Österreich |
| Mikrowelle | NN SD452 W | Panasonic, Kadoma, Japan |
| Nylonmembran, positiv geladen | Rolle | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (ehem. Roche) |
| Parafilm | Parafilm® M | VWR, Deutschland |
| PCR-tubes | Einzel, nukleasefrei | A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland |
| Petrischalen | Quadratisch, 120 * 120 mm, stapelbar, mit Belüftungsnocken, ohne Beschichtung, steril; CAT: 391-0465 | VWR (Greiner bio-one), Deutschland |
| | Rund, 94 mm, stapelbar, mit Belüftungsnocken, ohne Beschichtung, steril; CAT: 391-0490 | VWR (Greiner bio-one), Deutschland |
| Pipetten | 0,5 - 2 µL 1 - 10 µL 20 - 200 µL 100 - 1000 µL 500 - 5000 µL | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Reservoirs | Steril, 25 mL; CAT: 89094-664 | VWR, Deutschland |
| Schüttelkolben | Erlenmeyerkolben, mit Graduierung, 100-mL, ohne Schikane, mit Bördelrand, Borsilikatglas | Brand GmbH & co KG, Wertheim, Deutschland z.T. Geschenk der ehem. AG Johanningmeier |
| Silikonkappen für Schüttelkolben | SILICOSEN® C-Typ, C-40, 9231140 | Hirschmann, Vertrieb über Th. Geyer, Renningen, Deutschland |
| Spitzenboxen | Leer, mit Trägerplatte, autoklavierbar: | Brand GmbH & co KG, Wertheim, Deutschland |

| | | |
|---------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| | grau: 732990 gelb: 732992 blau: 732669 | |
| Spritzenfilter | 0,2 µm, CA, steril | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| Sprühflasche | 200 mL Fassungsvermögen, mit UV-Licht zu sterilisieren | Drogerie |
| Tropfpipetten | Dünne Spitze, steril, 1,5 mL; CAT: 612-4466 | VWR, Deutschland |
| Vis-Einweg-Küvetten | Halbmikro, Polysterol | Brand GmbH & co KG, Wertheim, Deutschland |
| Whatman Papier | 3030-917, 3MM | A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland |

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Sämtliche verwendete Puffer, Lösungen und Medien sind in Tabelle 2.1.3-1 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tabelle 2.1.3-1: Übersicht der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien.

| Puffer | Bestellnummer | | | Hersteller |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Buffer O | Mitgeliefert Restriktionsenzymen | zu | | Thermo Scientific, Massachusetts, USA |
| Duplex-Puffer, nukleasefrei | 11-01-03-01 | | | IDT, Iowa, USA |
| NEBuffer 2.1 (enthält 100 µg · mL ⁻¹ BSA) | B7202S | | | Neb, Ipswich, USA |
| Tris-Puffer 10 mM Tris HCl pH 7,4, nukleasefrei | B-006000-100 | | | Dharmacon Horizon, Lafayette, USA |
| Puffer | Zusammensetzung | pH | Bemerkung zur Herstellung | |
| TEN-Puffer für die PCI | | | | |
| NaCl | 150 mM | 8,0 | | |
| EDTA | 10 mM | | | |
| Tris HCl | 10 mM | | | |
| Lösung | Zusammensetzung | pH | Bemerkung zur Herstellung, Referenz | |
| Ampicillin-Stammlösung für die Selektion | | | | |
| Ampicillin, lösen in 50% Ethanol | 100 mg · mL ⁻¹ | | | Achtung Stäube!, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C, lichtgeschützt |
| Blot Lösung I für den Southern Blot | | | | |
| HCl | 25 M | | | |
| Blot-Lösung II für den Southern Blot | | | | |
| NaOH | 0,5 M | | | |
| NaCl | 1,5 M | | | |
| Blot-Lösung II für den Southern Blot | | | | |
| NH ₄ Ac | 1 M | | | |

| Hutner-Spurenelementlösung (Angaben für 1 L) für TAP-Medium | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EDTA Dinatriumsalz | 50 g in 250 mL ddH ₂ O | 6,7 | EDTA und H ₃ BO ₃ lösen sich bei RT nur schwer → Wasser aufkochen bzw. auf 40 °C erhitzen; das Lösen von FeSO ₄ · 7 H ₂ O sollte in warmen und entgasten Wasser erfolgen Schutzkleidung tragen Die Vorschrift zur Herstellung der Lösung ist im Anschluss an diese Tabelle vermerkt. [Hutner et al., 1950] |
| ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 22 g in 100 mL ddH ₂ O | | |
| H ₃ BO ₃ | 11,4 g in 200 mL ddH ₂ O | | |
| MnCl ₂ · 4 H ₂ O | 5,06 g in 50 mL ddH ₂ O | | |
| CoCl ₂ · 6 H ₂ O | 1,61 g in 50 mL ddH ₂ O | | |
| CuSO ₄ · 5 H ₂ O | 1,57 g in 50 mL ddH ₂ O | | |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O | 1,10 g in 50 mL ddH ₂ O | | |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 4,49 g in 50 mL ddH ₂ O | | |
| Hybridisierungspuffer für den Southern Blot | | | |
| SSC | 5x | | |
| Block-Reagenz | 1 % [v/v] | | |
| N-Laurylsarcosin | 0,1 % | | |
| SDS | 0,2 % [w/v] | | |
| Kaliumphosphatlösung für TAP-Medium | | | |
| K ₂ HPO ₄ | 288 g | | Autoklavieren, kühl lagern |
| KH ₂ PO ₄ | 144 g | | |
| ddH ₂ O auffüllen auf 1 L | | | |
| Kanamycin-Stammlösung für die Selektion | | | |
| Kanamycin, lösen in ddH ₂ O | 50 mg · mL ⁻¹ | | Achtung Stäube!, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C, lichtgeschützt |
| Me-Suc für die Transformation | | | |
| MAX Efficiency™ Transformation Reagent for Algea | | | Versetzt mit Sucrose, C _{final} = 40 mM |
| 3 M Natriumacetat-Lösung für die PCI & Southern Blot | | | |
| Natriumchloridlösung für TAP-Medium | | | |
| NaCl | 5 g | | Autoklavieren, kühl lagern |
| ddH ₂ O auffüllen auf 1 L | | | |
| Paromomycinlösung für die Selektion | | | |
| Paromomycin, lösen in ddH ₂ O | 12 mg · mL ⁻¹ | | Achtung Stäube!, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C, lichtgeschützt |
| Pronase-Lösung für die PCI | | | |
| Pronase | 1 g | | Gemisch bei 60 °C für 10 min inkubieren, mit 5 mL Glycerin mischen, aliquotieren und bei -20 °C lagern |
| CaCl ₂ | 0,011 g | | |
| Pronase und CaCl ₂ in 1 mL 1 M Tris HCl pH 7,5 lösen, dann 4 mL ddH ₂ O zugeben | | | |
| P1 für den Southern Blot | | | |
| Maleinsäure | 0,1 M | 7,5 | Autoklavieren, bei RT lagern |
| NaCl | 0,15 M | | |

| | | | |
|-----------------------------------------------------------|------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| P2 für den Southern Blot | | | |
| Block-Reagenz | 1 % | | gelöst in P1 |
| P3 für den Southern Blot | | | |
| Tris HCl | 100 mM | 9,5 | |
| NaCl | 100 mM | | |
| MgCl ₂ | 50 mM | | |
| Salzlösung für TAP-Medium | | | |
| NH ₄ Cl | 15 g | | Autoklavieren, kühl lagern |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 4 g | | |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 2 g | | |
| ddH ₂ O auffüllen auf 1 L | | | |
| 0,1 M Tris HCl (Angabe für 100 mL) | | | |
| Tris | 1,21 g | 7,5 | Maßkolben!, autoklavieren, kühl lagern |
| 1 M Tris HCl (Angabe für 100 mL) | | | |
| Tris | 12,11 g | 7,5 | Maßkolben!, autoklavieren, kühl lagern |
| Waschlösung I für den Southern Blot | | | |
| SSC | 2x | | |
| SDS | 0,1 % [w/v] | | |
| Waschlösung II für den Southern Blot | | | |
| SSC | 0,1x | | |
| SDS | 0,1 % [w/v] | | |
| 3 mM XSO ₄ – Arbeitslösung (Angabe für 10 mL) | | | |
| 30 mM XSO ₄ ⁻ Vorratslösung | 1 mL | | Steril filtrieren, kühl und lichtgeschützt lagern |
| 1 M Tris HCl pH 7,5 | 1 mL | | |
| Milli-Q Wasser (steril) | 8 mL | | |
| 30 mM XSO ₄ – Vorratslösung (Angabe für 10 mL) | | | |
| XSO ₄ | 0,109 g | | Lösen in 0,1 M Tris HCl pH 7; Maßkolben! Steril filtrieren, kühl und lichtgeschützt lagern Vorschrift dankend erhalten von der AG Hegemann, HU Berlin |
| 5x STOP (Ladepuffer für den Southern Blot) | | | |
| Tris HCl | 20 mM | 8,0 | Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt |
| EDTA | 50 mM | | |
| Glycerin | 50 % | | |
| Orange G | 0,1 % [w/v] | | |
| Medium | Zusammensetzung | pH | Bemerkung zur Herstellung, Referenz |
| LB-Miller (Lysogeny Broth) | | | |
| Tryptone | 10 g · L ⁻¹ | 7,0 | Modifiziert nach [Bertani, 1951]; autoklavieren, kühl lagern |
| NaCl | 10 g · L ⁻¹ | | |
| Hefeextrakt | 5 g · L ⁻¹ | | |
| TAP (Tris-Acetat-Phospat)* | | | |
| Salzlösung | 25 mL | 7,0 | [Gorman & Levine, 1965] |
| Tris | 2,42 g | | |

| | | | |
|----------------------------------------------------------------------|----------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kalium-Phosphatlösung | 0,375 mL | | |
| Natriumchloridlösung | 5 mL | | |
| Hutner-Spurenelemente-lösung | 1 mL | | |
| ddH ₂ O auffüllen auf 1 L, pH einzustellen mit Essigsäure | 17,4 mM Acetat | | [Harris (Hrsg.), 2009, „Chlamydomonas Sourcebook“ Vol. 1, S. 243] Autoklavieren, kühl lagern Vorschrift dankend erhalten von der ehem. AG Johanningmeier, MLU Halle |

Vorschrift zur Herstellung der Hutner-Spurenelementelösung, dankend erhalten von der ehem. AG Johanningmeier, MLU Halle.

Die in Tabelle 2.1.3-1 aufgelisteten Salze werden in der angegebenen Menge ddH₂O gelöst. Alle Lösungen, außer die EDTA-Lösung, zusammengeben und auf 95 °C aufkochen (Schutzkleidung!). Danach lässt man die Lösung auf 70 °C abkühlen und fügt nun die EDTA-Lösung hinzu. Es sollte eine Grünfärbung erfolgen. Vorbereitend für den nächsten Schritt muss das pH-Meter bei 70 °C kalibriert werden. Es erfolgt die Einstellung des pH-Wertes der Mischungslösung bei 70 °C mit 20%iger KOH auf 6,7. Ist dies erfolgt, füllt man auf 1 L mit ddH₂O auf und füllt es in einen Rundkolben um. Dieser wird mit einem Baumwollstopfen verschlossen und inkubiert bei RT 2 Wochen. Jeden Tag muss die Lösung kräftig geschüttelt werden. Während dieser Zeit erfolgt ein Farbumschlag von grün zu violett und ein rot-braunes Präzipitat fällt aus. Dies ist nach den 2 Wochen Inkubationszeit durch ein Whatman-Filter restlos abzufiltrieren. Die Lösung sollte á 500 mL aliquotiert werden und bei -20 °C gelagert werden.

*) Eine Angabe der Stoffmengen der einzelnen Komponenten der fertigen Lösung ist durch das Präzipitat nicht möglich. Im Buch „The Chlamydomonas Sourcebook“ Vol. 1, Kapitel „Chlamydomonas in the Laboratory“, S. 243, Tabelle 8.1 sind Angaben zu den Molaritäten aufgeführt. Diese Angaben gelten jedoch nur mit dem Hinweis, dass der Verlust an Stoffmenge durch das Präzipitat bei der Präparation der Hutner-Lösung ignoriert wurde.

2.1.4 Enzyme, Reagenzien, Antikörper und Kits für die Molekularbiologie

Sämtliche verwendete Enzyme, Reagenzien, DNA-Marker und Kits sind in Tabelle 2.1.4-1 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tabelle 2.1.4-1: Übersicht der verwendeten Enzyme, Reagenzien, DNA-Marker und Kits.

| Bezeichnung | Lieferant | Bestellnummer | Bemerkung |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Enzyme | | | |
| Cas9 (rekombinant aus <i>Streptococcus pyogenes</i>) | Dharmacon Horizon, Lafayette, USA | Edit-R, CAS11201 | c = 20 µM, Lieferumfang: 1000 pmol |
| DIG DNA-Markiermischung | Merck, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (ehem. Roche) | 11277065910 | |
| DNA Ligase, T4 | Thermo Scientific, Massachusetts, USA | EL0011 | Mitgeliefert: PEG-Lösung für Blunt-End-Ligationen; zugehöriger Puffer enthält ATP |
| GoTaq® G2 DNA Polymerase | Promega, Wisconsin, USA | M7841 | Mitgeliefert: GoTaq Puffer |
| NaeI | Neb, Ipswich, USA | R0190S | |
| Phusion Master Mix | Thermo Scientific, Massachusetts, USA | F521S | |
| PmlI | Neb, Ipswich, USA | R0532S | |
| Pronase | Merck, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (ehem. Vertrieben von Boehringer) | 10165921001 | |
| PvuII | Neb, Ipswich, USA | R0151S | |
| Q5 DNA Polymerase | Neb, Ipswich, USA | M0491L | Mitgeliefert: Q5 Puffer & Enhancer |
| Reagenzien | | | |
| Betain, 5 M, PCR-Zusatz | VWR, Deutschland | 733-1361 | |
| Block-Reagenz | Merck, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (ehem. Roche) | 11096176001 | |
| MAX Efficiency™ Transformation Reagent for Algae | Thermo Scientific, Massachusetts, USA | A24229 | Zu versetzen mit Sucrose, $c_{\text{final}} = 40 \text{ mM}$ |
| Antikörper | | | |
| Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente | Merck, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (ehem. Roche) | 11093274910 | Lagerung bei 4 °C |
| DNA Marker | | | |
| GeneRuler | Thermo Scientific, Massachusetts, USA | DNA Ladder Mix SM0331 | Ready-to-use |
| | | Express DNA Ladder SM1553 | |
| | | 1 kb DNA Ladder SM0313 | |

| Kits | | | |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------|-----------------|
| Cryopreservation Kit for Algae | Thermo Scientific, Massachusetts, USA | A24228 | |
| Gelextraktionskit | Neb, Ipswich, USA | T1020L | |
| GeneJET Plasmid Miniprep Kit | Thermo Scientific, Massachusetts, USA | K0503 | |
| PCR-Aufreinigungskit MSB [®] Spin PCRapache | Invitek, Berlin, Deutschland | 1020220400 | |
| Phire Plant Direct PCR Master Mix | Thermo Scientific, Massachusetts, USA | F160L | Phire Hot Start |

2.1.5 RNA und Primer

Sämtliche verwendete RNA-Sequenzen und Primer sind in Tabelle 2.1.5-1 in alphabetischer Reihenfolge bzw. nach aufsteigenden Nummern sortiert aufgelistet. In Abbildung 2.5.1-1 sind jene Primerbindestellen visualisiert, welche sich im *SNRK2.2*-Lokus befinden.

Tabelle 2.1.5-1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten RNAs und Primer, T_m und GC-Gehalt der Primer wurde ermittelt mit SnapGene.

| RNA | Sequenz (5'→3') | Bestellnummer, Lieferumfang | Lieferant | Bemerkungen | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| crRNA | UAGCGAGGAUGUCCA AUCAGGUUUUAGAGC <u>UAUGCU</u> (Überlappt mit der tracr) | Alt-R [®] , 2 nmol, custom | IDT, Iowa, USA | Lyophilisat wurde in je 10 mM nukleasefreiem Tris-Puffer (Dharmacon) aufgenommen, 100 µM Stock | |
| tracrRNA | AACAGCAUAGCAAGUU AAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGG UGC UUUUUUU | Alt-R [®] , 5 nmol, custom | IDT, Iowa, USA | | |
| Das Annealing, wodurch die cr- und tracrRNA zur sgRNA wird, ist dem Methodenteil (Tabelle 2.2.1-1) zu entnehmen. Eine Probe der sgRNA wurde dankend erhalten aus der AG Hegemann, HU Berlin. | | | | | |
| Primer | Sequenz (5'→3') | T _m [°C] | GC [%] | Lokus/Bereich | Hinweis |
| prAK_48 | TGGCTGCCAGACCCCAAAGC | 65 | 62 | <i>SNRK2.2</i> | #1713* |
| prAK_49 | GGGCGAGGACAGCACCTCTATG | 64 | 64 | <i>SNRK2.2</i> | #1716* |
| prAK_50 | TCCGGAACCAAACACACCTGCCT | 65 | 57 | <i>SNRK2.2</i> | #1497* |
| prAK_51 | GTTACCCATCCCCAACCCCGAAC | 66 | 64 | <i>SNRK2.2</i> | #1500* |
| prAK_52 | TACTTGGAAGCCTCACGCAC | 57 | 55 | <i>SNRK2.2</i> | d. A. |
| prAK_82 | CAGTTCGATGTAACCCACTC | 54 | 50 | VR Amp ^R | d. A. |
| prAK_83 | TAACGCTTACAATTTCCATTCGCC | 57 | 42 | VR f1 Ori | d. A. |
| prAK_84 | ACACAAAGCGAGGAGTCAG | 57 | 53 | <i>SNRK2.2</i> | d. A. |
| prAK_89 | AAGCAGCGTTCACCTTGTC | 60 | 55 | <i>SNRK2.2</i> | d. A. |
| prAK_90 | GGCCGGAAGGAATGCACTTG | 60 | 60 | <i>SNRK2.2</i> | d. A. |

| | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------|----|----|--------------------------|-------|
| prAK_101 | CTTCATTTCAGCTCCGGTTCC | 56 | 55 | VR Amp ^R | d. A. |
| prAK_102 | CACTCAACCCTATCTCGGTC | 55 | 55 | VR f1 Ori | d. A. |
| prAK_104 | TTTGGCTGCGCTCCTTCTGG | 61 | 60 | P_Rbcs2 | d. A. |
| prAK_105 | CCTGATGGTGTGGTGGCTG | 59 | 60 | VR | d. A. |
| prAK_112 | GCGGTGCCCTCCTGATAAAC | 59 | 60 | P_Rbcs2 | d. A. |
| prAK_113 | ACCGCCTACATACCTCGCTC | 59 | 60 | VR pBR322 Ori | d. A. |
| prAK_114 | TTTCAGCGACAAACGAGCAC | 57 | 50 | P_Hsp70A | d. A. |
| prAK_115 | AACGCCAGCTTCTCCTCAGAC | 60 | 57 | Pm ^R (dAK_10) | d. A. |
| prAK_116 | ACGAGCGCCTCCATTTACAC | 59 | 55 | T_Rbcs2 | d. A. |
| prAK_117 | CCCAATACGCAAACCGCCTC | 60 | 60 | VR | d. A. |
| Primer für die Sonden für den Southern Blot | | | | | |
| Sonde 1 (<i>codon usage</i> optimierte Pm ^R -Sequenz) | | | | | |
| prAK_123 | CAGAAGGAGCGCAGCCAAAC | 61 | 60 | P_Rbcs2 | d. A. |
| prAK_124 | GCCACCTTCACGAACAGCTC | 59 | 60 | Pm ^R (dAK_10) | d. A. |
| Sonde 2 (nicht <i>codon usage</i> optimierte Sequenz) | | | | | |
| prAK_71 | TGAGTGGGTTGTTGTGGAGG | 58 | 55 | Pm ^R (dAK_11) | d. A. |
| prAK_122 | CCAGCCACCAACACCATCAG | 60 | 60 | Pm ^R (dAK_11) | d. A. |
| Standardprimer | | | | | |
| M13uni-21 | GTAAAACGACGGCCAG | 54 | 56 | VR LacZ | d. A. |
| M13rev-29 | CAGGAAACAGCTATGACC | 51 | 50 | VR | d. A. |
| T3 | AATTAACCCTCACTAAAGGG | 50 | 40 | VR | d. A. |
| T7prom | TAATACGACTCACTATAGGG | 48 | 40 | VR | d. A. |

*) Geschenk der AG Hegemann, HU Berlin; prAK_#: Nummer in der Primer (pr) -sammlung dieser Arbeit; VR: Vektorrückgrad; d. A.: diese Arbeit

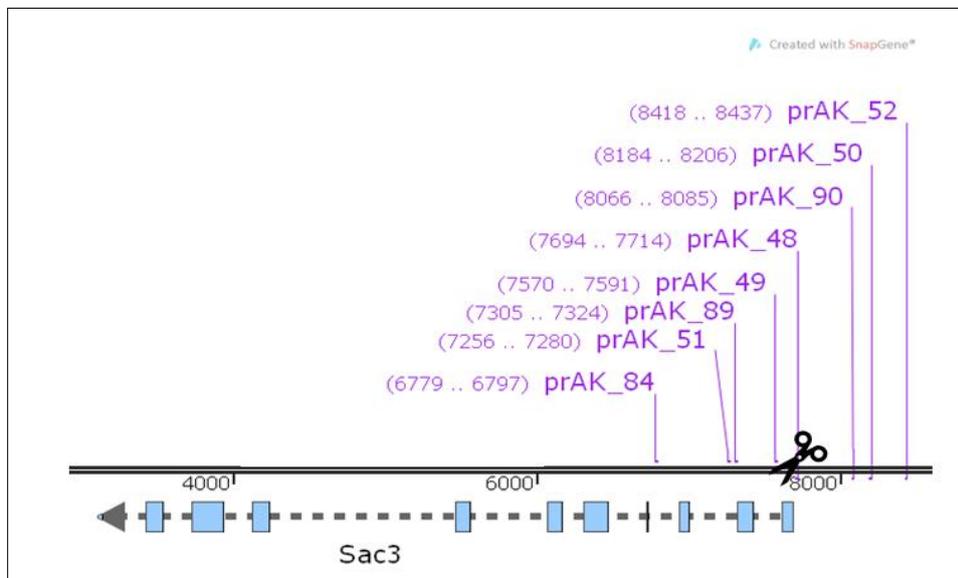


Abbildung 2.5.1-1: Darstellung der in dieser Arbeit genutzten Primer mit Bindestelle im SNRK2.2-Lokus (veraltet als Sac3 bezeichnet), die DSB-Stelle ist durch ein Scheren-Piktogramm visualisiert.

2.1.6 DNA-Reparatur-Donore

Die vorliegende Arbeit soll der Methodenetablierung des CRISPR/Cas-Systems für eine gerichtete Insertion im Genom von *C. reinhardtii* dienen. Es sollte untersucht werden, welche Art der DNA-Reparatur-Donoren zu den höchsten Ausbeuten an Insertions-Klonen führt. Für die Wahl der einzusetzenden Stoffmenge an DNA-Reparatur-Donor wurde sich an der Arbeit von [Greiner et al. 2017] orientiert. In dieser Arbeit wurden, ebenfalls zum Zwecke der Methodenetablierung, verschiedenen Arten an Donoren eingesetzt. Dabei kamen Plasmide (1 - 2 µg; 2 µg \cong 0,68 pmol) ebenso zum Einsatz wie doppel- oder einzelsträngige Sequenzen. In der vorliegenden Arbeit sollten zum Zwecke der Vergleichbarkeit der Ansätze untereinander in jedem Ansatz gleiche Stoffmengen an Donoren eingesetzt werden. In Tabelle 2.1.6-1 sind die Eigenschaften der in dieser Arbeit genutzten Donoren aufgelistet. Im Kapitel 2.2.6 ist die Bereitstellung der Donoren beschrieben.

Tabelle 2.1.6-1: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit genutzten Donoren, die zur Berechnung der einzusetzenden Stoffmengen diente. pPH75: codiert für die Paromomycin-Resistenz, codon usage optimiert; dAK_11, codiert für die Paromomycin-Resistenz, nicht codon usage optimiert.

Erklärung zu den Piktogrammen: Die Anwesenheit blauer Balken der Piktogramme zeigt an, ob homologe Bereiche Teil der Sequenz waren oder nicht; an den Piktogrammen ist außerdem ablesbar, ob es sich um doppel- oder einzelsträngige DNA handelt; die Bezeichnung „ODN“ (Oligonukleotid) wurde trotz dessen Länge von über 100 Nukleotideinheiten gewählt, da diese Bezeichnung in der Literatur für DNA-Reparatur-Donore verwendet wird.

| Pikto-gramm | Pm ^R -Sequenz/Designbasis | Bezeichnung | Kürzel | Größe | M [g · mol ⁻¹] | n in 1 µg | X µg für 0,68 pmol im Ansatz |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|--------|---------|----------------------------|-----------|------------------------------|
|  | pPH75 | pPH75 | dAK_10 | 4602 bp | 2843789,93 | 0,35 pmol | 1,93 µg |
|  | pPH114 | pPH114 | dAK_11 | 4687 bp | 2890730,20 | 0,34 pmol | 2 µg |
|  | | M13-Amplikon pPH114 | dAK_13 | 1946 bp | 1202517,74 | 0,83 pmol | 0,82 µg |
|  | | pUC57_dsODN7 | dAK_7 | 5015 bp | 3098977,33 | 0,32 pmol | 2,13 µg |
|  | | M13-Amplikon pUC57_dsODN7 | dAK_12 | 2389 bp | 1476288,56 | 0,65 pmol | 1,05 µg |
|  | | ssODN8 (sense) | dAK_8 | 2377 nt | 738178,04 | 1,35 pmol | 0,5 µg |
|  | | ssODN9 (antisense) | dAK_9 | 2377 nt | 730695,77 | 1,37 pmol | 0,5 µg |

Herkunft der Sequenzen sind dem Material- und Methodenteil, Vektorkarten sind dem Anhang zu entnehmen.

Tool zur Berechnung des Molekulargewichts (M):

<http://www.molbiotools.com/dnacalculator.html> (Empfehlung der Firma „clickbios“), für lineare Konstrukte: „5' hydroxyl“;

Umwandlung einer Seq. in die rev compl: https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

$$n = \frac{m}{M} = \frac{1 \cdot 10^{-6} \text{ g}}{1476288,56 \text{ g/mol}} = 6,77 \cdot 10^{-13} = 0,68 \cdot 10^{-12} = 0,68 \text{ pmol} \quad // \text{ Beispiel errechnet für dAK}_{12}$$

2.1.7 Vektoren und Kulturstämme

Die in Tabelle 2.1.7-1 aufgezählten Vektoren wurden in dieser Arbeit verwendet. Die Vektorkarten sind dem Anhang zu entnehmen, Sequenzen und Annotierungen sind dem digitalen Anhang, Ordner 1, zu entnehmen.

Tabelle 2.1.7-1: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren.

| Bezeichnung | Vektorgröße [bp] | Verwendung | Herkunft |
|-----------------|------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| dAK_10 (pPH75) | 4602 | Als DNA-Reparatur-Donor dAK_10 | [Sizova et al., 1996]; |
| dAK_11 (pPH114) | 4678 | Als DNA-Reparatur-Donor dAK_11 bzw. als Basis für andere Donoren | Geschenk der AG Hegemann, HU Berlin |
| pUC57_dsODN7 | 5015 | Als DNA-Reparatur-Donor dAK_7 bzw. als Basis für andere Donoren | Synthese, Biocat, Heidelberg, Deutschland |

Zur Generierung einiger DNA-Reparatur-Donoren wurden die Vektoren in *E. coli* produziert. Dafür wurden die in Tabelle 2.1.7-2 aufgezählten Stämme genutzt.

Tabelle 2.1.7-2: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit genutzten Stämme.

| Stamm | Plasmid | Wichtige Charakteristika & Verwendungszweck | Genotyp | Referenz |
|--------|-----------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| DH5α | dAK10 (pPH75) | Amplifikation der Vektoren, Amp ^R | <i>E. coli</i> F- fhuA2 lac(<i>del</i>)U169 phoA glnV44 φ80' lacZ(<i>del</i>)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 | |
| Beta10 | dAK_11 (pPH114) | Amplifikation der Vektoren, Amp ^R | <i>E. coli</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>araD139 fhuA</i> Δ <i>lacX74 galK16 galE15 e14-</i> φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 <i>recA1 relA1 endA1 nupG rpsL</i> (Str ^R) <i>rph spoT1</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) | Neb, Ipswich, USA |

| | | | | |
|--------|--------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Beta10 | pUC57_dsODN7 | Amplifikation der Vektoren, Kan ^R | <i>E. coli</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>araD139 fhuA</i> Δ <i>lacX74</i> <i>galK16 galE15</i> <i>e14-ϕ80dlacZ</i> Δ <i>M15 recA1</i> <i>relA1 endA1 nupG rpsL</i> (Str ^R) <i>rph spoT1</i> Δ (<i>mrr- hsdRMS-mcrBC</i>) | Neb, Ipswich, USA |
|--------|--------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|

In dieser Arbeit wurde der *C. reinhardtii* Stamm CC-125 (mt⁺) genutzt. Dessen Basisstamm ist der „137c“ WT-Stamm, isoliert von G. M. Smith in der Region um Amherst, Massachusetts. CC-125 (mt⁺) beherbergt im Gegensatz zum „c137“ die nit1 & nit2 Mutation, weshalb dieser auf Nitrat als alleinige Stickstoffquelle nicht leben kann. CC-125 (mt⁺) besitzt weiterhin das AGG1 Allel für phototaktische Aggregation. Es handelt sich bei CC-125 (mt⁺) um einen Stamm, dessen Zellwand intakt ist. Dementsprechend ist dieser Stamm robust und für Fermentationen im Labormaßstab geeignet. Der Stamm wurde aus der Stammsammlung „Chlamydomonas Resource Center“ in Massachusetts erworben.

In der Publikation von Pröschold, Harris & Coleman wird *C. reinhardtii* als erste Modellalge beschrieben, welcher ein Genomprojekt gewidmet wurde [Pröschold et al., 2005]. In dieser Publikation ist bildhaft der Herkunft des CC-125 (mt⁺) vom 137c-Stamm gezeigt.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm CC-125 (mt⁺) ist, wie eingangs in der Einleitung unter 1.1.2 beschrieben, der Ausgangsstamm für viele mutierte Organismen; darunter CC-503 cw92 (mt⁺). Die in der NCBI-Datenbank für CC-503 cw92 (mt⁺) hinterlegte Sequenz wurde verifiziert (siehe Kapitel 3.5) und als Basis für das Design der guiding RNA und der *alignments* (Kapitel 3.5.1 & 3.5.2) genutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Design der gRNA und Assemblierung des RNP-Komplexes

Die in dieser Arbeit verwendete gRNA wurde mit dem online Tool CRISPR-P (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>) designt. Dieses Tool sagt mögliche *Off-targets* voraus, das Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* ist hinterlegt. Die Sequenz der gRNA ist der Tabelle 2.1.5-1 zu entnehmen.

Annealing cr- & tracrRNA

Um die gRNA zu generieren, wurden die cr- und tracrRNA wie folgt zusammengebracht:

Tabelle 2.2.1-1 Annealing cr- & tracrRNA.

| | C _{Stock} | C _{final} |
|---------------|--------------------|--------------------|
| crRNA | 100 µM | 10 µM |
| tracrRNA | 100 µM | 10 µM |
| Duplex Puffer | | |

Im Thermocycler wurde ein Programm eingestellt, welches für 2 min 95 °C hielt, anschließend erfolgte eine Temperaturrampe bis auf 20 °C im 0,1 ° · sec⁻¹-Interval.

Assemblierung RNP-Komplex

Die so generierte sgRNA wurde wie folgt mit der Cas9 komplexiert:

Tabelle 2.2.1-2 Assemblierung RNP-Komplex.

| | C _{Stock} | C _{final} |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|
| sgRNA | 10 µM | 3 µM |
| Cas9 | 20 µM | 3 µM |
| Buffer O | 10fach | 1fach |
| H ₂ O, nukleasefrei | | |

Die Komplektierung erfolgte bei 37 °C für 15 min, danach würde der RNP-Komplex auf Eis gelagert.

Der RNP wurde 1 Tag vor bzw. am Tag der Transformation vorbereitet. Pro Ansatz werden 4 µL eingesetzt.

2.2.2 Zellkultivierung und Synchronisation

Die Zellen wurden in TAP-Medium im Schüttelkolben (100 mL Fassungsvermögen für 50 mL-Schüttelkultur) bei 100 rpm kultiviert. Die Anzucht erfolgte entweder im Dauerlicht (23 °C, 30 µE · m⁻² · s⁻¹) oder unter Tages- und Nachtzyklen, ohne Dämmerungsphasen. Die Bedingungen für den „Tag“ waren 14 h, 25 °C, 30 - 50 µE · m⁻² · s⁻¹, die Nacht dauerte 10 h, 18 °C ohne Beleuchtung.

Vorbereitend auf die Transformation wurde die Zellkultur min 10 d zuvor synchronisiert. Ziel dessen war das Erreichen einer möglichst homogenen Zellsuspension, homogen in Bezug auf das Alter der Zellen und vor allem das Zellzyklusstadium [Spudich und Sager, 1980]. Dazu kultivierte man die Zellsuspension bei Tages- und Nachtzyklen und setzte die Kultur aller 3 d um. 24 h vor der Transformation wurde eine Zellzahl von 0,5 · 10⁶ Zellen · mL⁻¹ eingestellt. Der Wechsel zur Nacht erfolgte immer 13 Uhr, sodass die Transformation am Folgetag zu Beginn der Dunkelphase (Abbildung 2.2.2-1 hellblauer Bereich) erfolgen konnte. Zu dieser Zeit ist sowohl NHEJ (*non-homologous end joining*) als auch HR (*homologous recombination*) theoretisch möglich, wobei letzterer in *C. reinhardtii* in der Literatur als ein seltenes Ereignis (1

von 10^4) beschrieben wird [Zorin et al., 2005]. In dieser Arbeit sollten beide Wege adressiert werden.

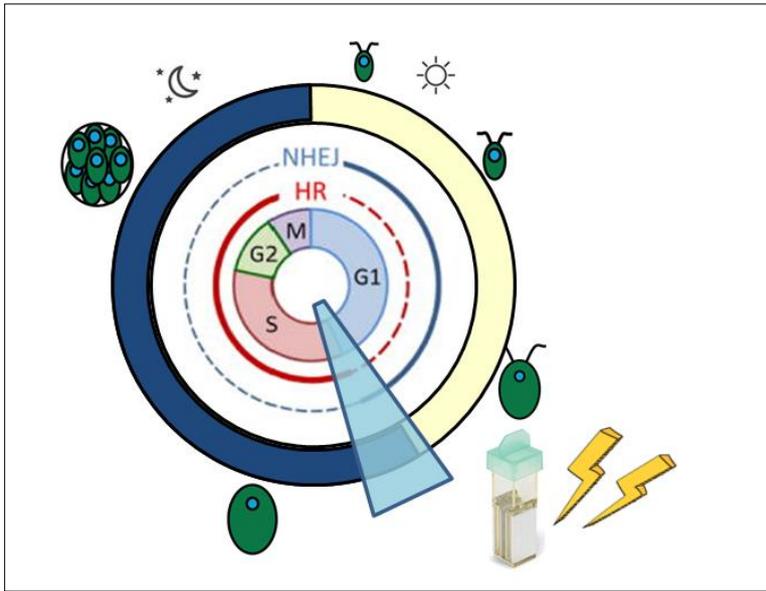


Abbildung 2.2.2-1: Schematische Darstellung des Zellzyklus in Zusammenhang mit den Tages- & Nachtzyklen der *C. reinhardtii*-Kultur und des entsprechenden Zeitfensters für die Transformation. Zellzyklusstadien: M: Mitose, G1: Gap Phase 1 (Zellwachstum, keine DNA-Replikation), S: Synthesephase, G2: Gap Phase 2 (Vorbereitung Mitose); Phasen, in welchem die Reparaturmechanismen NHEJ (*non-homologous end joining*) und HR (*homologous recombination*) hauptsächlich auftreten. Symbolhaft sind die jeweiligen Wachstumsphasen der Zelle gezeigt. Diese Abbildung wurde zu Teilen aus der Publikation von [Iyama und Wilson III, 2013] zusammengesetzt.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte indirekt über die Messung der Optischen Dichte (OD) bei 750 nm. Der Zusammenhang zwischen der OD und der Zellzahl ist für jeden Stamm spezifisch. Für den CC-125 (mt+) konnte mittels Durchflusszytometrie (BD FACSalibur optics system) folgender Zusammenhang gefunden werden:

$$\text{Zellzahl} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot 10^6 = 5,0455 \cdot \text{OD}_{750}$$

Dazu wurde eine Kalibriergerade erstellt, wobei die OD_{750} gegen die im FACS ermittelte Zellzahl $\cdot \text{mL}^{-1}$ aufgetragen wurde. Genutzt wurden synchronisierte Zellsuspensionen äquidistanter OD_{750} von 0 bis 0,25 es erfolgte eine Dreifachbestimmung. Der Messbereich wurde durch das FACS-Gerät limitiert. Die Messungen erfolgten unter der Anleitung von Frau Claudia Misiak, AG Hüttelmaier, Core Facility Imaging, MLU.

2.2.4 Kryokonservierung und Aufweckung

Die Kulturen wurden mittels des Kits „Cryopreservation Kit for Algae“ (Thermo, A24228) nach Herstellerangaben eingefroren und später wieder aufgetaut. Nach Herstellerangaben sind die eingefrorenen Proben 1 Jahr garantiert haltbar. Eine Lagerung darüber hinaus ist möglich, jedoch mit einer längeren Phase des Anwachsens nach dem Auftauen verbunden. Um Reagenz A zu sparen, wurden 22,5 mL Suspensionskultur mit 0,5 mL Reagenz A versetzt. Der Ansatz konnte, limitiert durch die Schüttelleistung des Tischschüttlers, leider nicht weiter verringert werden. Um eine schrittweise Herunterkühlung der Proben zu gewährleisten, wurden die Röhrchen für die Kryo-Lagerung in einem *Freezing Container* (Thermo, „Mr. Frosti“) eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Pro Klon wurden mehrere Ansätze eingefroren, da immer das gesamte Röhrchen aufgetaut wird.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Zum Auftrennen von DNA-Fragmenten wurde eine horizontale Flachbett-Gelelektrophoreseanlage genutzt. Es wurden 1%-ige Agarosegele hergestellt, indem 0,6 g Agarose 60 mL 1fach TAE-Puffer in der Mikrowelle unter Erhitzen (nicht Kochen) gelöst wurden. Es wurden 36 μL einer $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ethidiumbromidlösung in die heruntergekühlte Lösung hinzugegeben, geschwenkt und sofort in die Gelkammer inkl. Gelkamm gegossen. Nachdem das Gel gelatiert war, konnte der Kamm entfernt und die Proben aufgetragen werden. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 bis 100 V für 45 - 60 min. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Syngene G:Box; Software: GeneTools analysis.

2.2.6 Bereitstellung der DNA-Reparatur-Donoren

2.2.6.1 Bereitstellung der plasmidären Donoren: Isolation von Plasmiden aus *E. coli*

Die *E. coli*-Stämme wurden in 5-mL-Kulturröhrchen in LB-Medium inklusive des entsprechenden Antibiotikums bei 37 °C und 150 rpm ü. N. angezogen. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Herstellerangaben mittels des GeneJET Plasmid Miniprep Kits von Thermo Scientific. Die Qualitätsbestimmung der DNA-Isolation erfolgte mit dem Nanodrop, die Qualitätsbestimmung der Sequenz erfolgte als Sequenzierauftrag bei der Firma LGC Genomics.

2.2.6.2 Bereitstellung der lineare, doppelsträngigen Donoren: M13-PCR und Gelextraktion

Um die linearen, doppelsträngigen Donoren zu generieren, wurden die Plasmide dAK_11 und pUC57_dsODN7 mittels der M13-Standardprimer einer PCR zur Amplifizierung der dazwischen liegenden Pm^R-Kassette (ohne bzw. mit homologen Armen) unterzogen.

Tabelle 2.2.6.2-1: Pipettierschema für die M13-PCR zur Bereitstellung der linearen doppelsträngigen Donoren.

| | C _{Stock} | C _{final} |
|--------------------|----------------------------|---------------------------|
| H ₂ O | | |
| Q5 Puffer | 5fach | 1fach |
| Q5 Enhancer | 5fach | 1fach |
| Betain | 1 M | 200 mM |
| dNTPs | 10 mM (each) | 0,2 mM (each) |
| M13uni-21 | 25 pmol · μL ⁻¹ | 25 pmol |
| M13rev-29 | 25 pmol · μL ⁻¹ | 25 pmol |
| Q5 HiFi Polymerase | 2 U · mL ⁻¹ | 0,02 U · μL ⁻¹ |
| Template DNA | 100 ng · μL ⁻¹ | 250 ng |

$$\Sigma = 50 \mu\text{L}$$

Tabelle 2.2.6.2-2: PCR-Programm für die M13-PCR zur Bereitstellung der linearen doppelsträngigen Donoren.

| | | | | |
|---|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------|
| 1 | 98 °C | 2 min | Initialdenat.-Temp. | · 29 |
| 2 | 98 °C | 30 sec | Denat. | |
| 3 | 50 °C | 30 sec | Annealing | |
| 4 | 72 °C | 45 sec für dAK11 1 min 40 sec für pUC57_dsODN7 (Prozessionszeit Q5: 30-40 sec pro kb) | Elong. | |
| 5 | 72 °C | 10 min | Finale Elong. | |
| 6 | 10 °C | hold | | |

Erwartete Fragmentgrößen

dAK_11: 1946 bp

pUC57_dsODN7: 2477 bp

Die Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Kit-basierter Gelextraktion isoliert. Die Qualitätsbestimmung der DNA-Isolation erfolgte mit dem Nanodrop, die Aufkonzentration erfolgte mittels der SpeedVac. Da die Ausbeuten nach der Gelextraktion gering waren, wurden entsprechend viele M13-PCRs parallel zueinander angesetzt. So konnten die nötigen Mengen an Donor gewonnen werden. Die Qualitätskontrolle der Sequenz erfolgte als Sequenzierauftrag bei der Firma LGC Genomics.

2.2.6.3 Bereitstellung der linearen, einzelsträngigen Donoren

Die einzelsträngigen Donoren wurden mittels Auftragsgensynthese von der Firma GENEWIZ bezogen. Die Qualitätskontrolle der Sequenz war Teil der Firmenleistung.

Tabelle 2.2.6.3-1: Einzelsträngige DNA-Reparatur-Donore.

| Einzelsträngiger DNA-Reparatur-Donor | Sequenz | Lieferant | Bemerkung |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| dAK_8 dAK_9 | Siehe digitaler Anhang, Ordner 1, Länge: 2377 nt | Genewiz, Brooks LifeScience, Chelmsford, USA | Lieferumfang: 3 µg, Lyophilisat; zu lösen in Duplex-Puffer (Dharmacon), Stock: 0,5 µg · µL ⁻¹ |

2.2.7 Transformation

Der Ablauf der Transformation ist in Abbildung 2.2.7-1 dargestellt. Die Einstellung am NEPA21 sind die folgenden: Poring Pulse: 1mal 8 ms/300 V, Abklingrate: 40 %; Polarity-exchanged Transferpuls: 5mal 50 ms/20 V, 50 ms-Interval, Abklingrate: 40 %.

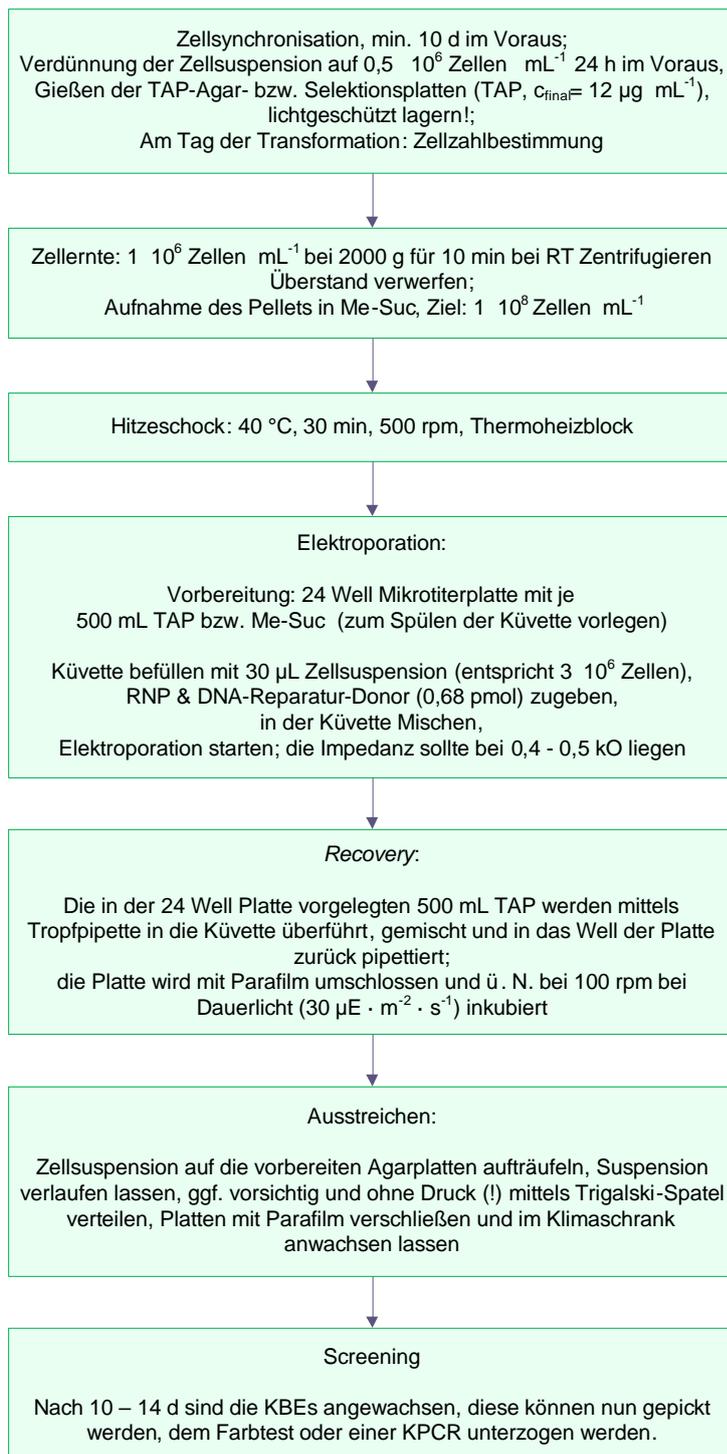


Abbildung 2.2.7-1: Fließschema Arbeitsschritte zur Durchführung der Transformation.

2.2.8 Farbttest

In der vorliegenden Arbeit wurde der *SNRK2.2*-Lokus für den Cas9-getriebenen DSB genutzt. Dieser Lokus wurde gewählt, da ein dort erfolgter DSB phänotypisch zu einer sichtbaren Veränderung der Zellen führt und ein *screening* ermöglicht (siehe Einleitung Kapitel 1.1.5).

Die in dieser Arbeit verwendete Vorschrift wurde dankend erhalten von der AG Hegemann, HU Berlin. In Abbildung 2.2.8-1 sind beispielhaft die Ergebnisse eines Farbtests in Suspensionskultur (V-Bottom Platte) und auf Agar gezeigt.

Farbttest in Suspensionskultur (96-Well-V-Bottom Platte)

5 μL der 3 mM XSO_4 -Arbeitslösung (Tabelle 2.1.3-1, Lösungen) in eine V-Bottom Platte vorlegen und mit 40 μL Zellsuspension mischen, abdecken mit PCR-Abdeckfolie, ü. N. im Klimaschrank inkubieren, bei 2000 g & RT zentrifugieren; Blaufärbung des Überstandes sollte nach 16 h sichtbar sein

Farbttest auf der Agar-Platte (unter der Flow-Box!)

Mit 2-3 Pumpstößen der 3 mM XSO_4 -Arbeitslösung (Tabelle 2.1.3-1, Lösungen) aus ca. 20 cm Entfernung Agarplatte besprühen, vollständig trocknen lassen, dann Deckel und Platte mit Parafilm schließen; Inkubation ü. N. im Klimaschrank inkubieren; Blaufärbung der Höfe um die Kolonie sollte nach 16 h sichtbar sein

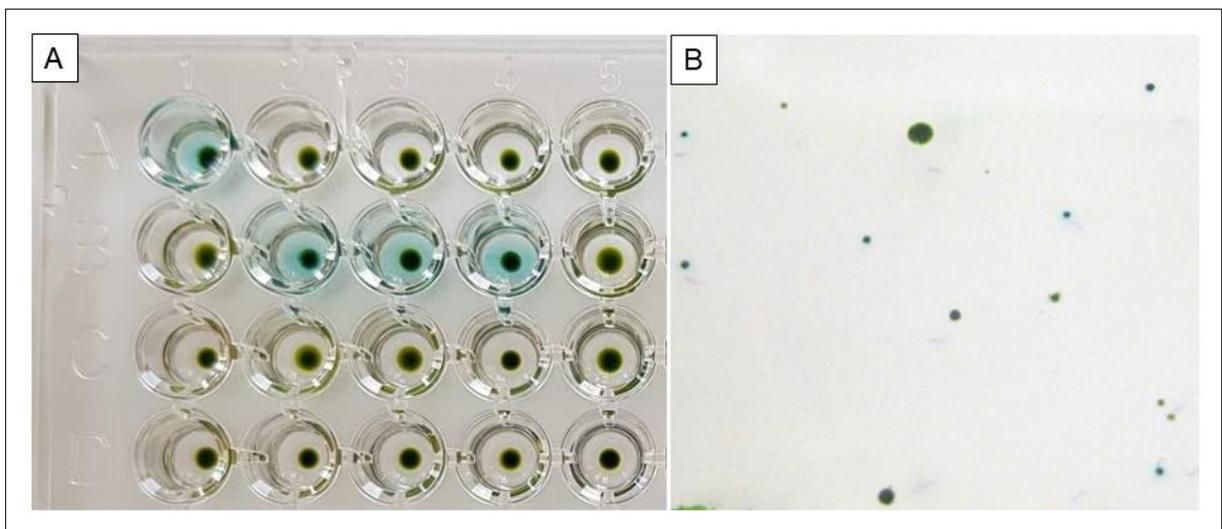


Abbildung 2.2.8-1: Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses eines Farbtests in A: Suspensionskultur und B: auf der Agar-Platte 16 h nach Zugabe des Substrates XSO_4 , Farbttest negative Transformanten (Pm^{R} grün) und positive (Pm^{R} blau) Klone, auch als CRISPR-Klone bezeichnet, sind hierbei nebeneinander gezeigt.

2.2.9 Kolonie-PCR (KPCR)

Neben dem Farbttest kam eine weitere *screening*-Methode zum Einsatz, die Kolonie-PCR. Da es Ziel der Arbeit war, nicht nur im *SNRK2.2*-Lokus einen DSB einzufügen, sondern exakt an dieser Stelle ein Zielgen einzufügen, musste auch dies überprüft werden. Hierfür wurde das Kit Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific) genutzt:

Transfer eines 40 μL Aliquots der Zellsuspensionen in eine 96-Well V-Bottom Platte, Zentrifugation bei 2000g, 10 min, RT, Überstand verwerfen. Das Pellet wird in 20 μL Dilutionpuffer aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgt die Zentrifugation bei 4000g für 10 min bei RT. Hinweis: Eine Lagerung des Überstandes leider nicht über mehrere Tage möglich (weder bei 4 °C noch bei -20 °C).

Tabelle 2.2.9-1: Pipettierschema für die KPCR.

| | C _{Stock} | C _{final} |
|------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------|
| H ₂ O | | |
| prAK_48 bzw. 50 | 25 pmol · μL^{-1} | 12,5 pmol |
| prAK_49 bzw. 51 | 25 pmol · μL^{-1} | 12,5 pmol |
| Betain | 1 M | 200 mM |
| Phire Plant MM (dNTPs, Polymerase, Puffer, hotstart) | 2fach | 1fach |
| DNA-Extrakt | undefiniert | |

$$\Sigma = 25 \mu\text{L}$$

Tabelle 2.2.9-2: PCR-Programm für die KPCR.

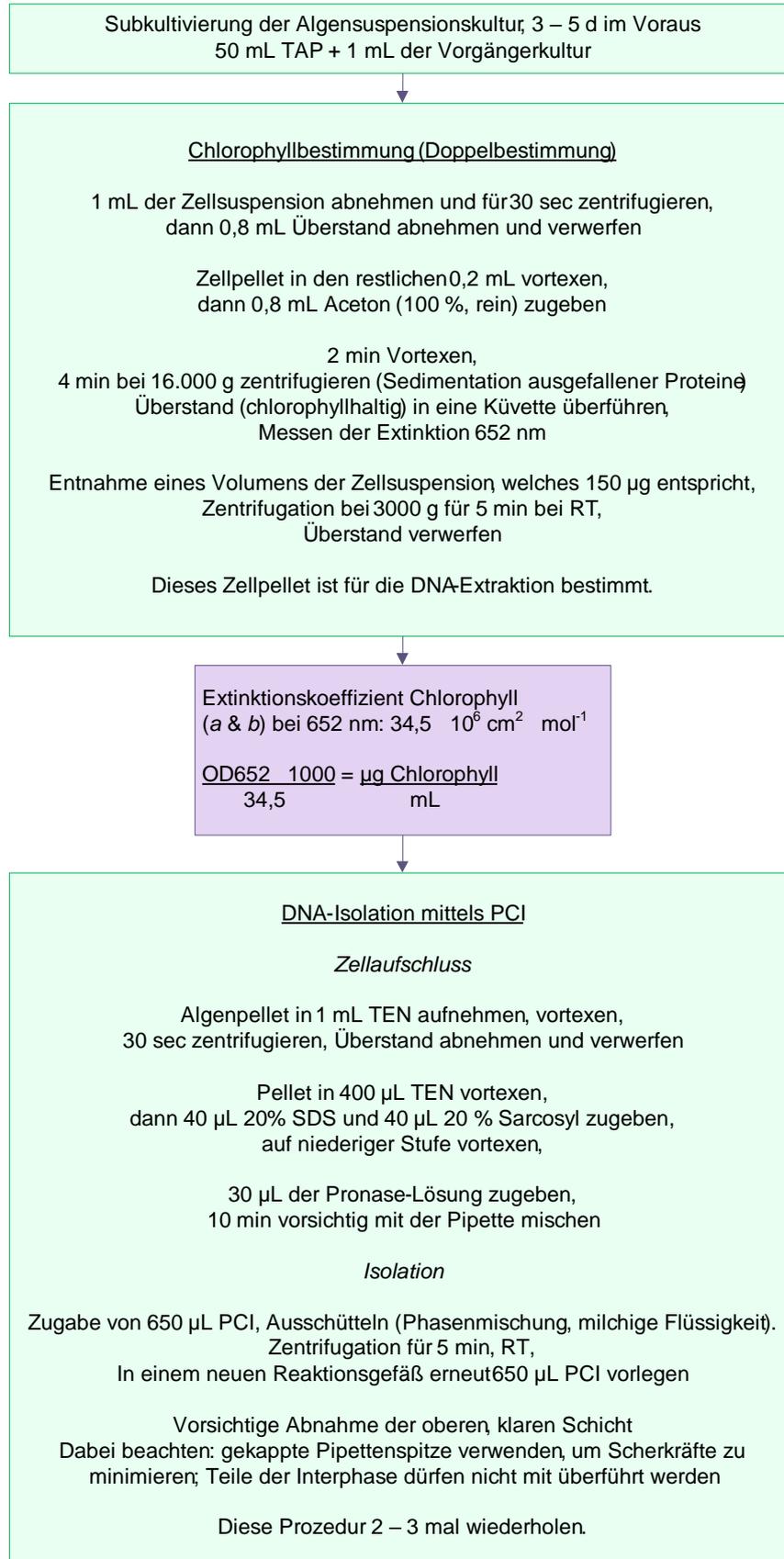
| | | | | |
|---|-------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|------|
| 1 | 98 °C | 5 min | Initialdenat.-Temp | · 29 |
| 2 | 98 °C | 10 sec | Denat. | |
| 3 | 66 °C | 10 sec | Annealing | |
| 4 | 72 °C | 1 min 30 sec (Prozessionszeit der Phire: 1000 bp · min ⁻¹) | Elong. | |
| 5 | 72 °C | 2 min | Final. Elong. | |
| 6 | 10 °C | hold | | |

Erwartete Fragmentgrößen:

| | |
|-----------------|-----------|
| nt | - |
| WT prAK_48 & 49 | 145 bp |
| WT prAK_50 & 51 | 951 bp |
| CRISPR-Klone | unbekannt |

Für die Analyse mittels Gelelektrophorese wurden 10 μL Probe aufgetragen.

2.2.10 Isolation der Gesamtzell-DNA mittels PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol)



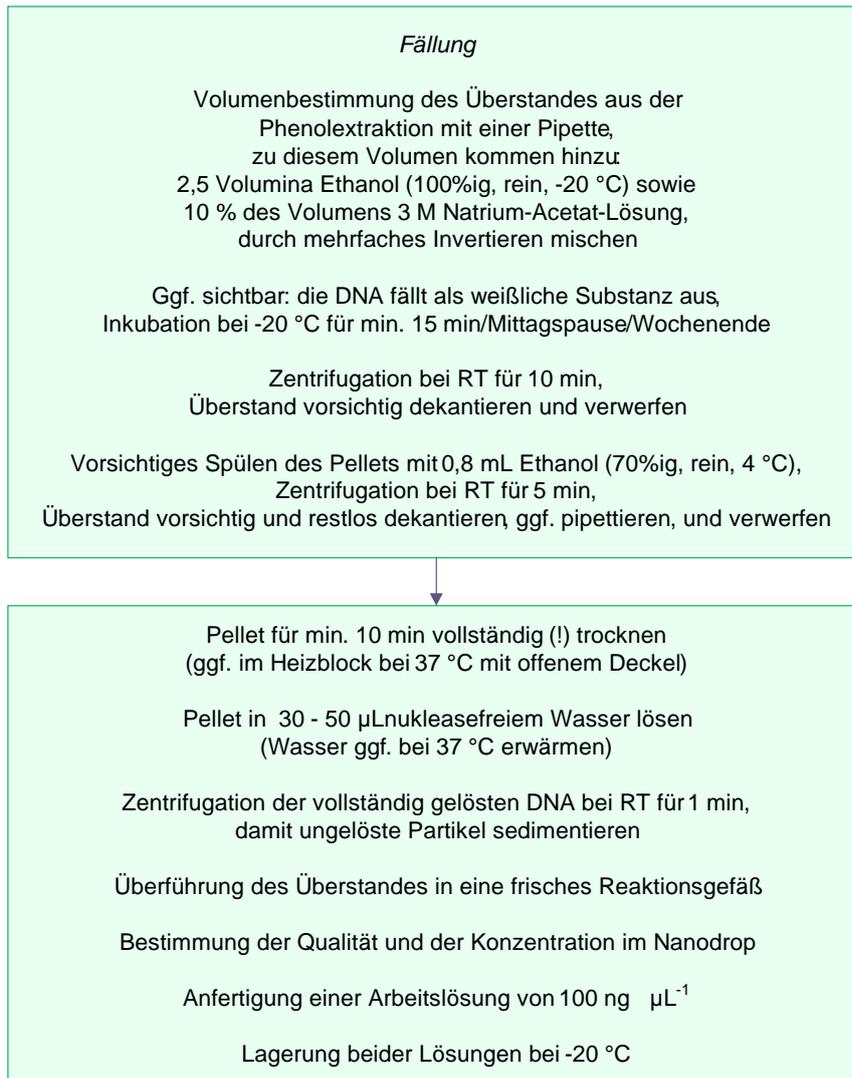


Abbildung 2.2.10: Fließschema für die Isolation der Gesamtzell-DNA aus *C. reinhardtii* mittels PCI.

Um die Gesamtzell-DNA zu isolieren, wurde die Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol mit anschließender Ethanol-fällung gewählt. Das Prozedere wurde aus der ehem. AG Johanningmeier, Halle, übernommen und ist in Abbildung 2.2.10 dargestellt.

2.2.11 Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung

Zeigte das Ergebnis der KPCR eine vom WT abweichende Fragmentgröße, so wurde eine weitere PCR durchgeführt. Das dabei entstandene Fragment wurde mit den entsprechenden Primern der Firma LGC Genomics zur Sequenzierung (*custom premium run*) zugesandt. Ein entsprechendes *PCR clean up* war Teil der Firmenleistung. Als Primer kamen, je nach Klon, alle in Tabelle 2.1.5-1 von prAK_50 bis 117 gelisteten Primer sowie die Standardprimer M13, T3 & T7prom, zum Einsatz.

Tabelle 2.2.11-1: Pipettierschema für die Generierung der zu sequenzierende Fragmente.

| | C _{Stock} | C _{final} |
|--------------------|----------------------------|---------------------------|
| H ₂ O | | |
| Q5 Puffer | 5fach | 1fach |
| Q5 Enhancer | 5fach | 1fach |
| Betain | 1 M | 200 mM |
| dNTPs | 10 mM | 0,4 mM |
| Oligo fw | 25 pmol · μL ⁻¹ | 25 pmol |
| Oligo rv | 25 pmol · μL ⁻¹ | 25 pmol |
| Q5 HiFi Polymerase | 2 U · mL ⁻¹ | 0,02 U · μL ⁻¹ |
| Template DNA | 100 ng · μL ⁻¹ | 250 ng |

$$\Sigma = 50 \mu\text{L}$$

Tabelle 2.2.11-2: PCR-Programm für die Generierung der zu sequenzierende Fragmente.

| | | | | |
|---|-------|--------|--------------------|------|
| 1 | 98 °C | 5 min | Initialdenat.-Temp | · 29 |
| 2 | 98 °C | 20 sec | Denat. | |
| 3 | 68 °C | 20 sec | Annealing | |
| 4 | 72 °C | 2 min | Elong. | |
| 5 | 72 °C | 10 min | Final. Elong. | |
| 6 | 10 °C | hold | | |

Die Auswertung der Sequenzierungen wurde mit der Software SnapGene (Vollversion) vorgenommen.

2.2.12 Effizienzbestimmungen

Vorweg die Erläuterung der Kürzel:

Pm^R grün: KBEs, welche auf Paromomycin wachsen, aber im Farbttest negativ sind

Pm^R blau/CRISPR-Klone: KBEs, welche auf Paromomycin wachsen, im Farbttest positiv

+/- RNP: Transformation wurde mit/ohne RNP durchgeführt

Die Selektionsfrequenz [Greiner et al., 2017; Shin et al., 2016] stellt die Anzahl an KBEs dar, welche nach der Transformation auf Selektionsmedium wachsen; dividiert durch die Zellzahl, die in der Transformation eingesetzt wurden. Für die vorliegenden Arbeit bedeutet das:

$$\text{Selektionsfrequenz} = \frac{\text{PmR grün} + \text{PmR blau}}{3 \text{ Mio Zellen}}$$

Der Begriff der Selektionseffizienz wurde in der Literatur genutzt [Ferenczi et al., 2017]. Dabei wurde die Anzahl an Zielkolonien durch die Anzahl jener KBE, welche auf Medium ohne Selektionsmarker wuchsen, dividiert (siehe 3.1). Für die vorliegende Arbeit bedeutet das:

$$\text{Selektionseffizienz [\%]} = \left(\frac{\text{PmR blau}}{\text{lebensfähige KBE}} \right) \cdot 100$$

Die Targeteffizienz („*targeting efficiency*“, [Greiner et al., 2017], [Baek et al., 2016]) berechnet sich aus der Anzahl an Zielkolonien („*targeted colonies*“) geteilt durch die Anzahl an Kolonien, welche auf Selektionsmarker („*selected colonies*“) wachsen.

Für die vorliegende Arbeit bedeutet das:

$$\text{Targeteffizienz [\%]} = \left(\frac{\text{PmR blau}}{\text{PmR grün} + \text{PmR blau}} \right) \cdot 100$$

Die Reparatur-Modus-Effizienz ist ein Begriff, welcher in der vorliegenden Arbeit eingeführt wird. Dabei soll nicht nur die Richtigkeit des targetierten Locus eingehen, sondern auch die Richtigkeit/Vollständigkeit des Inserts (1). Ebenso soll die Abwesenheit ungewollter Sequenzabschnitte eine Rolle spielen (2). Ungewollte Sequenzabschnitte sind dabei Fragmente des Vektorrückgrades (sofern der Donor plasmidär ist) oder Fragmente, deren Ursprung nicht auf den Donor zurückzuführen sind.

$$\text{Reparatur-Modus-Effizienz 1 [\%]} = \left(\frac{\text{PmR blau (PmR Kasette vollständig inseriert)}}{\text{PmR grün} + \text{PmR blau}} \right) \cdot 100$$

Reparatur-Modus-Effizienz 2 [\%] =

$$\frac{\text{PmR blau (PmR Kasette vollständig inseriert; keine zusätzlichen Sequenzen)}}{\text{PmR grün} + \text{PmR blau}} \cdot 100$$

2.2.13 Southern Blot

Der Southern Blot beruht auf der Methode, mit Hilfe einer (in diesem Fall) DIG-markierten Sonde DNA-Fragmente einer im Agarosegel aufgetrennten Probe sichtbar zu machen. Die Herstellung der Sonde erfolgt wie folgt:

PCR, Template-Generierung für die DIG-Markierung:

Tabelle 2.2.13-1: Pipettierschema für die PCR.

| | C _{Stock} | C _{End} |
|----------------------------------------|----------------------------|------------------|
| H ₂ O | | |
| Oligo fw | 25 pmol · μL ⁻¹ | 10 pmol |
| Oligo rev | 25 pmol · μL ⁻¹ | 10 pmol |
| Phusion MM (dNTPs, Polymerase, Puffer) | 2fach | 1fach |
| gDNA | | 100 ng |

$$\Sigma = 20 \mu\text{L}$$

Tabelle 2.2.13-2: PCR-Programm für die PCR.

| | | | | |
|---|-------|--------|---------------|------|
| 1 | 95 °C | 3 min | Initialdenat. | · 35 |
| 2 | 95 °C | 30 sec | Denat. | |
| 3 | 58 °C | 30 sec | Annealing | |
| 4 | 72 °C | 30 sec | Elong. | |
| 5 | 72 °C | 5 min | Final Elong. | |
| 6 | 10 °C | hold | | |

5 µl für ein Testgel

DIG-Markierung der Sonde

Tabelle 2.2.13-3: Pipettierschema für die DIG-Markierung der Sonde.

| | C _{Stock} | C _{End} |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| H ₂ O | | |
| Oligo fw | 25 pmol · µL ⁻¹ | 25 pmol |
| Oligo rev | 25 pmol · µL ⁻¹ | 25 pmol |
| GoTaq G2 | 5 U · µL ⁻¹ | 5 U |
| GoTaq Buffer | 5fach | 1fach |
| DIG DNA-Markierungsmix (enthält dNTPs & DIG-dUTP) | 10fach | 1fach |
| DNA-Template | Aus der vorangegangenen PCR: 1 µL | |

$$\Sigma = 20 \mu\text{L}$$

Dieser Ansatz wird parallel zu einem Ansatz durchgeführt, welcher anstelle des DIG DNA-Markierungsmix unmarkierte dNTPs enthält. Dies dient als Kontrolle.

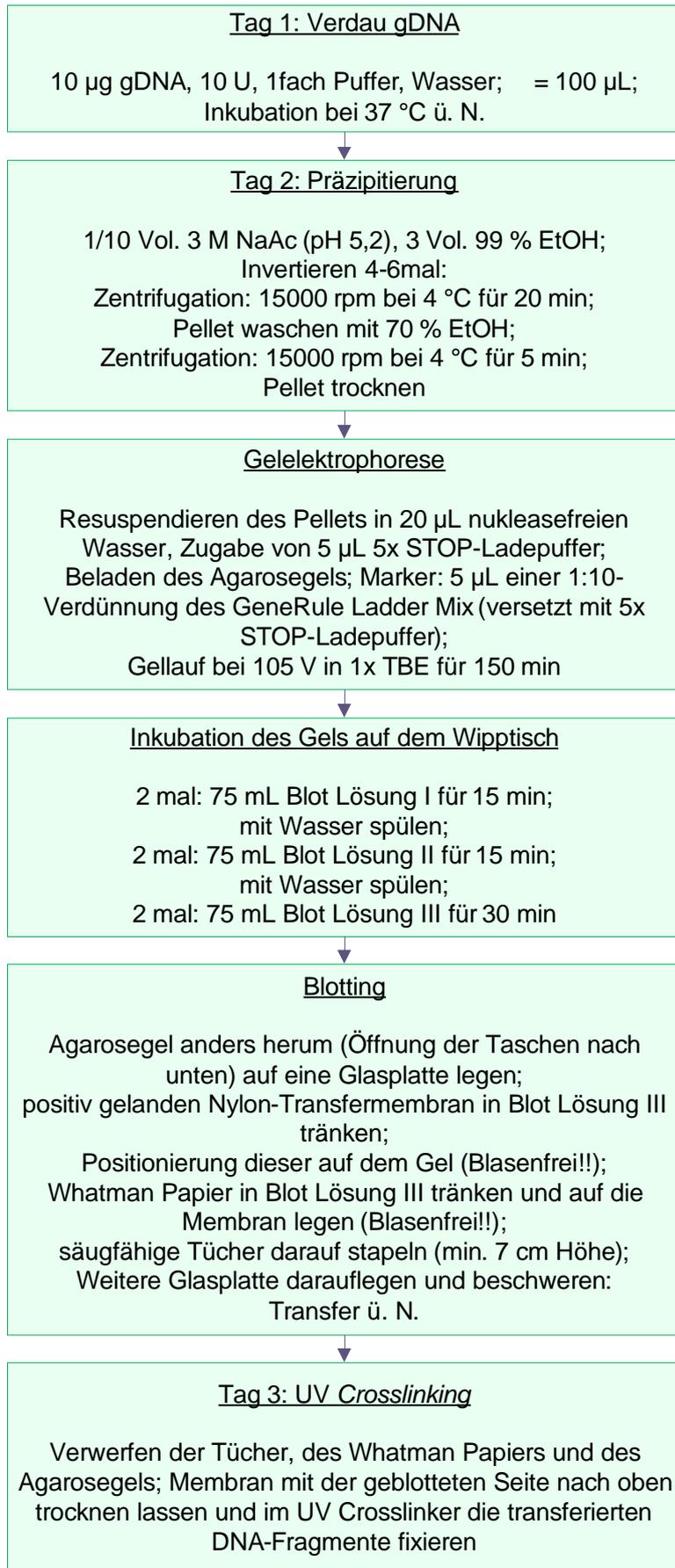
Tabelle 2.2.13-4: PCR-Programm für die DIG-Markierung der Sonde.

| | | | | |
|---|-------|--------|---------------|------|
| 1 | 95 °C | 3 min | Initialdenat. | · 29 |
| 2 | 95 °C | 30 sec | Denat. | |
| 3 | 58 °C | 30 sec | Annealing | |
| 4 | 72 °C | 1 min | Elong. | |
| 5 | 72 °C | 5 min | Final Elong. | |
| 6 | 10 °C | hold | | |

5 µL für ein Testgel

Bei erfolgreicher Markierung: Fragment aus dem Agarosegel ausschneiden und über ein Gelextraktionskit nach Angaben des Herstellers aufreinigen.

Der Ablauf der sich hieran anschließenden Southern Blot-Methode ist in Abbildung 2.2.13-2 dargestellt.



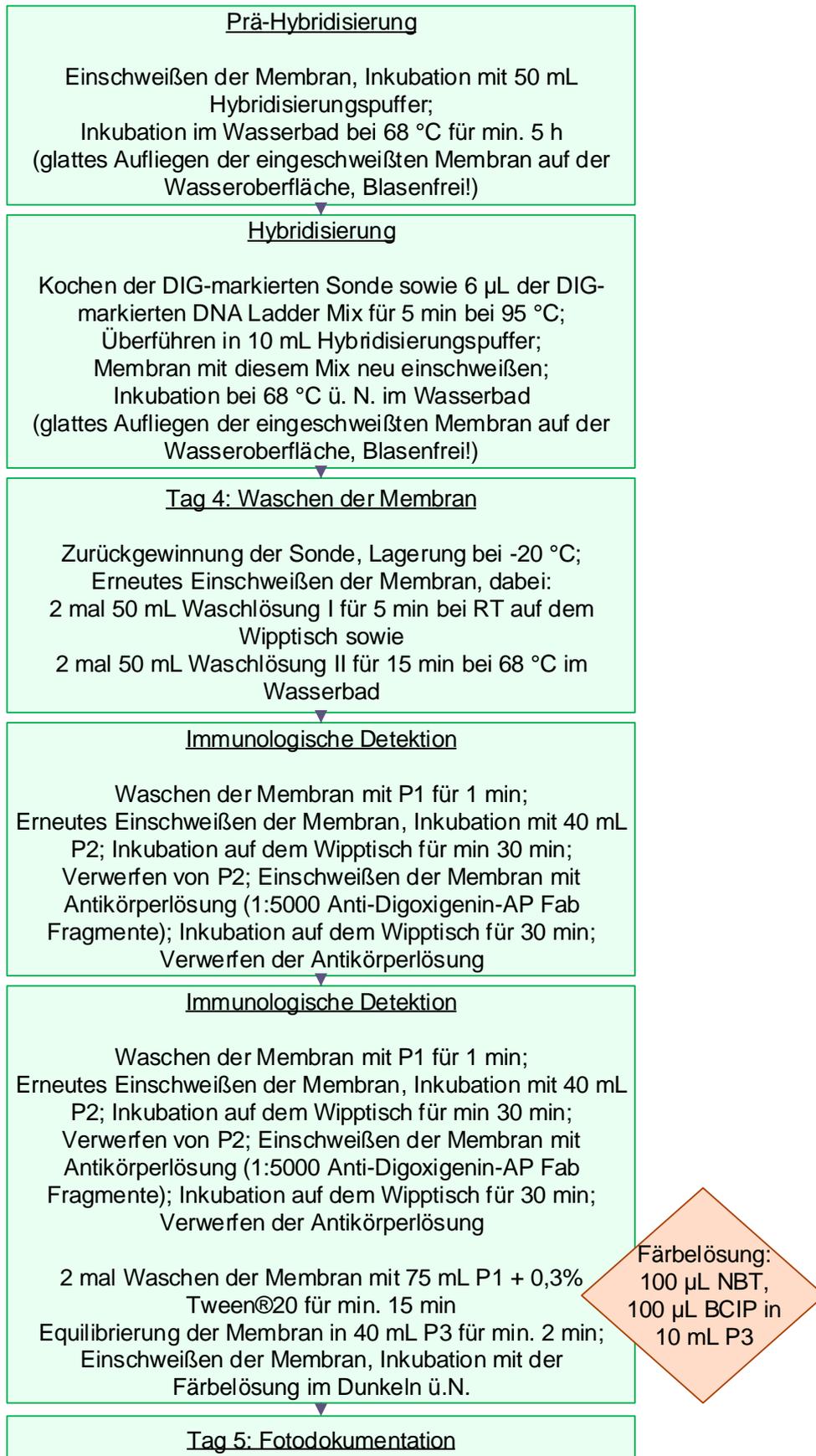


Abbildung 2.2.13-2: Fließschema Southern Blot.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erweiterung von Methoden zur gezielten Modifikation des Kerngenoms der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) mithilfe der CRISPR/Cas Technologie. Das Projektziel war hierbei die Insertion einer funktionalen Kassetten ins Kerngenom. Dies bildet die methodische Basis für eine Nutzung der Mikroalge als Produktionsorganismus. Es wurden zunächst *knock out* Experimente durchgeführt. Nachdem die Transformationsbedingungen (z.B. Menge an Ribonukleoprotein-Komplex (RNP), Verhältnis RNP:guiding RNA, Vorwiderstand der Probe in der Küvette (Impedanz)) etabliert wurden, konnten die Zielerperimente designt werden. Für die geplante Insertion wurden verschiedene Donor-Reparatur-DNAs, im Folgenden als Donore bezeichnet, entwickelt. Mit deren Hilfe sollte eine vollständige, präzise sowie effiziente Insertion eines Zielgens erfolgen. Als Genkassette, die inseriert werden sollte, wurde eine Sequenz gewählt, die für das Enzym Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase aus *Streptomyces rimosus* codiert. Dieses vermittelt eine Resistenz gegen Paromomycin. Dadurch können Klone, die die korrekte Insertion enthalten und ein funktionales Enzym produzieren, selektiert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit genutzte Genkassette ist in Abbildung 3-1 schematisch dargestellt. Eine Resistenz gegenüber Paromomycin wird auch als „Pm^R“ bezeichnet, weshalb der codierende Bereich für die Paromomycinresistenz in der vorliegenden Arbeit auch als Pm^R-Sequenz bezeichnet wird. Die Genkassette wurde publiziert [Sizova et al., 1996] und setzt sich zusammen aus einem Doppelpromotor (pflaumenfarbene Pfeile), der codierend für die Paromomycinresistenz (türkisfarbener Pfeil), einem Intron der kleinen Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-carboxylase (I_Rbcs2, gestrichelte Linie) und einem Terminator der kleinen Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-carboxylase (T_Rbcs2). Der Doppelpromotor setzt sich zusammen aus dem Promoter des Hitzeschockproteins 70A (P_Hsp70A) sowie des Promotors der kleinen Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-carboxylase (P_Rbcs2) [Schroda et al., 2001].

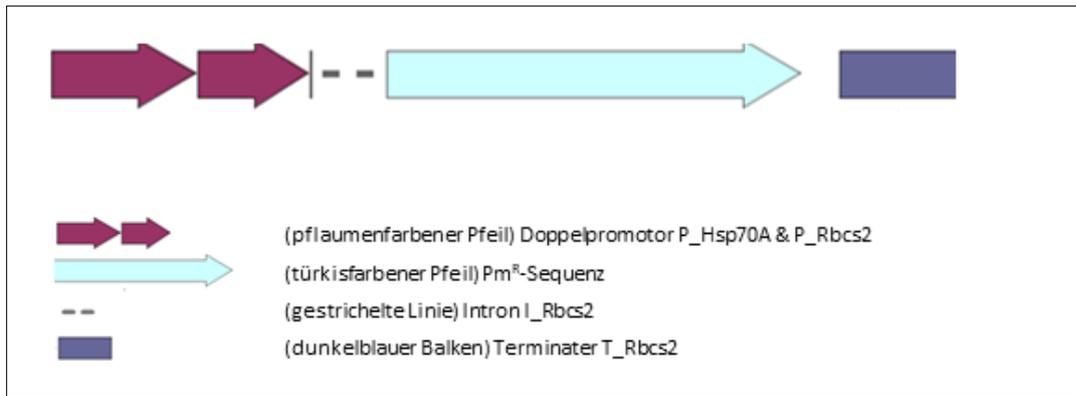


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Genkassette, die für das Enzym Aminoglycosid-3-phosphotransferase (AphVIII) codiert und damit die Resistenz gegen Paromomycin (Pm^R) vermittelt [Sizova et al., 1996]. Bausteine: pflaumenfarbene Pfeile: Doppelpromotor, türkisfarbener Pfeil: Pm^R-Sequenz, gestrichelte Linie: Intron, dunkelblauer Balken: Terminator.

Es wurde die mittels CRISPR/Cas eine gezielte Insertion an einer Stelle im Genom (*SNRK2.2*-Lokus) angestrebt, bei der die, durch Sulfatverfügbarkeit regulierte Synthese des Enzyms Arylsulfatase (ARS), entkoppelt wird. Dadurch kommt es zu einer permanenten Produktion der ARS. Die erfolgreiche Insertion an dieser Stelle kann mit einem Farbttest auf aktive ARS nachgewiesen werden. Die Anzahl der Klone, welche nach der Transformation eine positive Reaktion in diesem Farbttest (CRISPR-Klone) zeigten, wurde zur Berechnung der Transformationseffizienz verwendet. Diese Klone wurden außerdem sequenziert, sodass der Insertionsort der Donore genau identifiziert werden konnte und Aussagen zur Präzision und Vollständigkeit der Insertion getroffen werden konnten. Es schlossen sich Untersuchungen zu weiteren Insertionsorten mittels Southern Blot an (siehe Kapitel 3.6).

Für die Methodenetablierung des CRISPR/Cas-Systems zur gerichteten Insertion im Genom von *C. reinhardtii* sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Donore auf die Effizienzen der Insertion hat. Die Paramomycin-Resistenz-Kassette wurde sowohl in Form von zirkulären Plasmiden, als auch linearisierter doppelsträngiger und einzelsträngiger Donore bereitgestellt. Für die Wahl der einzusetzenden Stoffmenge an Donor wurde sich an der Arbeit von Greiner *et al.* orientiert [Greiner et al. 2017]. In dieser Arbeit wurden, ebenfalls zum Zwecke der Methodenetablierung, verschiedenen Arten an Donoren eingesetzt. Dabei kamen Plasmide (1 - 2 µg; 2 µg \cong 0,68 pmol, siehe Tabelle 2.1.6-1 im Material- und Methodenteil) ebenso zum Einsatz wie doppel- oder einzelsträngige Sequenzen. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Zwecke der Vergleichbarkeit der Ansätze untereinander in jedem Ansatz gleiche Stoffmengen an Donoren eingesetzt werden. Auf Grund technischer Restriktionen (zu hoher Vorwiderstand in der Küvette bei zu großem Volumen an Donor) fiel die Wahl auf 0,68 pmol DNA-Reparatur-Donor. In Material- und Methodenteil Tabelle 2.1.6-1 sind die Eigenschaften der in dieser Arbeit genutzten Donoren aufgelistet. Im Kapitel 2.2.6 ist die Bereitstellung der Donoren

beschrieben. Die Konstrukte wurden mit oder ohne homologe flankierende Bereiche zum targetierten *SNRK2.2*-Lokus von *C. reinhardtii* eingesetzt. Eine Übersicht über die verwendeten Konstrukte findet sich in Tabelle 3-1. Die Probennummern in Spalte „#“ entsprechen den Nummern in den in diesem Kapitel aufgeführten Diagrammen.

Tabelle 3-1: Auflistung der bei den Transformationsansätzen genutzten DNA-Reparatur-Donoren inkl. der in dieser Arbeit genutzten Piktogramme. Eigenschaften der Donoren, wie Sequenzlänge und molare Masse, sind der Tabelle 2.1.6-1 im Material- und Methodenteil aufgelistet. Die Herkunft der Sequenzen sind dem Material- und Methodenteil Kapitel 2.1.6, Vektorkarten und Sequenzinformationen sind dem Anhang bzw. dem digitalen Anhang zu entnehmen.

Abkürzungen: ss: *single stranded DNA*, ds: *double stranded DNA*, RNP: Ribonukleoprotein.

| # | RNP | DNA-Reparatur-Donor | | | | | | | | |
|----|-----|----------------------------------------------|------------------------------|--------|----------|--------|------------------|-------|------------|--|
| | | Pm ^R - Sequenz/ Designbasis | Name | Kürzel | zirkulär | linear | Homologe Arme | ss/ds | Piktogramm | |
| 1 | + | <i>codon usage</i> optimiert | pPH75 | dAK_10 | X | | | | ds | |
| 2 | + | nicht <i>codon usage</i> optimiert | pPH114 | dAK_11 | X | | | | ds | |
| 3 | - | | pPH114 | dAK_11 | X | | | | ds | |
| 4 | + | | M13-Amplikon pPH114 | dAK_13 | | X | | | ds | |
| 5 | - | | M13-Amplikon pPH114 | dAK_13 | | X | | | ds | |
| 6 | + | | pUC57_dsODN7 | dAK_7 | X | | X | | ds | |
| 7 | - | | pUC57_dsODN7 | dAK_7 | X | | X | | ds | |
| 8 | + | | M13-Amplikon pUC57_dsODN7 | dAK_12 | | X | X | | ds | |
| 9 | - | | M13-Amplikon pUC57_dsODN7 | dAK_12 | | X | X | | ds | |
| 10 | + | | ssODN8 (<i>sense</i>) | dAK_8 | | | X | X | ss | |
| 11 | + | | ssODN9 (<i>antisense</i>) | dAK_9 | | | X | X | ss | |

Hinweis: Die Bezeichnung „ODN“ (Oligonukleotid) wurde trotz dessen Länge von über 100 Nukleotideinheiten gewählt, da diese Bezeichnung in der Literatur für DNA-Reparatur-Donoren verwendet wird.

Erklärung zu Tabelle 3-1: Pm^R-Sequenz / Designbasis

Es wurden in dieser Arbeit u.a. zwei Plasmide als DNA-Reparatur-Donoren verwendet: dAK_10 (pPH75) und dAK_11 (pPH114). Beide codieren für die Resistenzkassette gegen Paromomycin (Pm) und werden auch als pAphVIII (Aminoglycosid-3'-phosphotransferase Typ VIII) [Sizova et al., 1996] bezeichnet. Beide Plasmide wurden in der AG Hegemann (HU, Berlin) entwickelt; „PH“ steht dabei für „Peter Hegemann“. Der pPH75 codiert für eine für *C. reinhardtii codon usage* optimierte Variante der pAphVIII und ist ansonsten identisch mit dAK_11 verstanden werden, welcher eine noch nicht *codon usage* optimierte Pm^R-Sequenz codiert. Diese Plasmide dienen als Basis der vergleichenden Transformationsversuche.

In den Kapiteln 3.2 – 3.5 werden verschiedene Effizienzbegriffe beschrieben (siehe Einleitung Kapitel 1.1.7). Dabei wurde der in der vorliegenden Arbeit generierte Datensatz auf verschiedenen Wegen ausgewertet. Die Notwendigkeit dazu ergab sich aus der nicht konformen Nutzung des Begriffs „Effizienz“ in der Literatur. Um die Einordnung der in der vorliegenden Arbeit generierten Daten in die Literatur zu ermöglichen, wurde diese mehrfache Art der Auswertung gewählt.

3.1 Untersuchung des Einflusses des RNP-Komplexes auf die Vitalität von *Chlamydomonas reinhardtii*

Der Komplex aus Nuklease (Cas9) und der *guiding* RNA (gRNA) wird als RNP (Ribonukleoprotein) - Komplex bezeichnet. Dieser führt den Doppelstrangbruch (DSB) in der genomischen DNA ein. Um sicher zu stellen, dass der Zusatz des RNP-Komplexes keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat, wurden Transformationen mit und ohne RNP-Komplex durchgeführt. Der Versuch wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Für die Experimente zur gezielten Modifikation des Kerngenoms von *C. reinhardtii* mittels CRISPR/Cas wurden die Zellen am Übergang von der G1 zur S-Zellzyklusphase homogenisiert und synchronisiert [Spudich und Sager, 1980]. Dies wurde erreicht, indem die Zellsuspension in definierten Tag- und Nachtzyklen kultiviert wurde (siehe Kapitel 2.2.2). Jeweils $3 \cdot 10^6$ Zellen wurden in der Elektroporationsküvette vorgelegt und mit dem jeweiligen Donor versetzt, je nach Ansatz d. h. mit oder ohne RNP-Komplex. Das Transformationsprozedere wurde wie in Abbildung 2.2.7-1 beschrieben durchgeführt. Es wurden entsprechende Verdünnungen angefertigt und die Ansätze auf Agarplatten ohne Selektionsmedium ausgestrichen. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden ausgezählt und unter Berücksichtigung der Verdünnung auf die eingesetzte Zellzahl ($3 \cdot 10^6$ Zellen) in der Küvette bezogen. Der daraus resultierende prozentuale Anteil stellt die Vitalität dar, also jener Anteil, welcher lebensfähige Nachkommen erzeugen kann [Sherba et al., 2020]. In Tabelle 3.1-1 sind die absoluten KBEs und die Werte für die Vitalität gezeigt.

Tabelle 3.1-1: Auflistung der Versuchsansätze inkl. der bei jedem Ansatz gefundenen KBEs und der Vitalität; es wurde auf Medium ohne Selektionsmarker ausplattiert, eingesetzt wurden $3 \cdot 10^6$ Zellen, $n = 3$.

| # | RNP | Donor | Kürzel | Anzahl der lebensfähigen KBE* | Vitalität [%] |
|----|-----|------------------------------|--------|-------------------------------|---------------|
| 1 | + | pPH75 | dAK_10 | 13.988,67 ± 812,9 | 0,47 ± 0,03 |
| 2 | + | pPH114 | dAK_11 | 14.300 ± 2.165,27 | 0,48 ± 0,07 |
| 3 | - | pPH114 | dAK_11 | 15.843,33 ± 592 | 0,53 ± 0,02 |
| 4 | + | M13-Amplikon pPH114 | dAK_13 | 14.586,67 ± 1.146,53 | 0,49 ± 0,04 |
| 5 | - | M13-Amplikon pPH114 | dAK_13 | 10.466,67 ± 1.747,26 | 0,35 ± 0,06 |
| 6 | + | pUC57_dsODN7 | dAK_7 | 10.486,67 ± 1.642 | 0,35 ± 0,05 |
| 7 | - | pUC57_dsODN7 | dAK_7 | 12.173,33 ± 3.128,46 | 0,41 ± 0,1 |
| 8 | + | M13-Amplikon pUC57_dsODN7 | dAK_12 | 12.333,33 ± 2.358,61 | 0,41 ± 0,08 |
| 9 | - | M13-Amplikon pUC57_dsODN7 | dAK_12 | 14.553,33 ± 3.929,5 | 0,49 ± 0,13 |
| 10 | + | ssODN8 | dAK_8 | 13.493,33 ± 2.480,43 | 0,45 ± 0,08 |
| 11 | + | ssODN9 | dAK_9 | 13.070 ± 1.761,16 | 0,44 ± 0,06 |

*) Die Anzahl spiegelt das arithmetische Mittel aus drei Versuchen wider.

Die Vitalität der Zellen lag unabhängig vom Versuchsansatz im Bereich von 0,35 bis 0,53 %. Die unterschiedlichen Donore und das Vorhandensein des RNP-Komplexes im Transformationsansatz zeigten hierbei keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen nach der Transformation. Die Transformationsbedingungen selbst führten zu einer Reduktion der Vitalität von 99,47 bis 99,65 %. Diese Werte konnten nicht mit der Literatur verglichen werden, da vergleichbare Experimente für *C. reinhardtii* nicht gefunden werden konnten. Die in den folgenden Kapiteln bestimmte Effizienz und damit die Quantität an positiven Klonen wird maßgeblich von der Vitalität beeinflusst, deshalb war dieses Ergebnis für das weitere Vorgehen der Versuche für diese Arbeit wichtig. Dass die Wahl des Donors und der RNP-Komplex keinen Einfluss auf die Vitalität haben, erlaubt direkte Vergleiche der Transformationsansätze untereinander.

3.2 Bestimmung der Selektionsfrequenz

Der Einfluss des RNP-Komplexes und der Art des Donors auf die Vitalität konnte experimentell ausgeschlossen werden (Kap. 3.1). Darauf basierend wurde im Folgenden die in der Einleitung des Ergebnisteils erläuterte Transformation von *C. reinhardtii* mit verschiedenen DNA-Reparatur-Donoren in An- und Abwesenheit des RNP-Komplexes untersucht. Die detaillierte Durchführung und Auswertung sind in den methodischen Kapiteln 2.2.7 und 2.2.8 beschrieben. Die Versuche, welche unter Abwesenheit des RNP-Komplexes und damit der Cas9 durchgeführt wurden, dienten als Kontrolle für den Anteil der ungerichteten Insertion.

Ziel der folgenden Datenanalyse der Transformationsversuche war zunächst die Bestimmung der Selektionsfrequenz. Unter der Selektionsfrequenz versteht man den Quotienten der Kolonien bildenden Einheiten (KBE), die auf dem Selektionsmedium gewachsen sind und der

Anzahl der für die Transformation eingesetzten Zellen ($3 \cdot 10^6$ Zellen im Ansatz) [Greiner et al., 2017; Shin et al., 2016]. Die Selektionsfrequenz ist ein Maß für die Häufigkeit der Insertion des Resistenz-vermittelnden Zielgens.

In Abbildung 3.2-1 sind zunächst die Anzahl sowie der Phänotyp der Paromomycin-resistenten KBEs (Pm^R) nach der Transformation mit den verschiedenen DNA-Reparatur-Donoren auf Selektionsmedium dargestellt. Die phänotypischen Unterschiede der KBE lassen einen Rückschluss auf den Insertionsprozess der Resistenz-vermittelnden Kasette zu.

Bei der Auszählung der auf Selektionsmedium gewachsenen Klone traten nach dem Farbttest (siehe Material- und Methodenteil, Kapitel 2.2.8) drei verschiedene Phänotypen hervor: Klone, die grüne Kolonien bildeten („ Pm^R grün“), Kolonien, die im Farbttest eine blaue Färbung zeigten („ Pm^R blau“) und Kolonien, die zunächst grün aussahen, nach 10 – 15 Tagen jedoch eine gelbliche Verfärbung aufwiesen („ Pm^R gelb“).

Die KBE mit der Bezeichnung „ Pm^R grün“, sind Transformanten, bei denen es vermutlich durch eine stabile, jedoch zufällige, genomische Insertion der Selektionskasette zur Paromomycin-Resistenz kam. Für Transformationen mit doppelsträngiger plasmidärer oder linearisierter DNA (Tabelle 3.2-1, Ansatz #1 – #9) wurden durchschnittlich 136 KBE „ Pm^R grün“ gezählt, wobei der Wert bei Ansatz #7 (doppelsträngig, linear, mit homologen Bereichen) etwas niedriger liegt (109). Die Anzahl an KBEs der Ansätze, bei welchen mit einzelsträngigen Donoren gearbeitet wurde, liegt mit 62 bzw. 64 (Abbildung 3.2-1, Ansatz #10 und #11) unter diesem Wert.

„ Pm^R blau“ kennzeichnet KBE, die im Arylsulfatase-Nachweis mittels Farbttest positiv waren. Demnach ist bei diesen Zellen von einer *SNRK2.2*-Lokus-spezifischen und demnach gerichteten Insertion der Selektionskasette auszugehen. Diese Klone werden im Folgenden als „CRISPR-Klone“ bezeichnet. In den Ansätzen #1 (Donor: Plasmid, ohne homologe Arme, *codon usage* optimiert), #2 (Donor: Plasmid, ohne homologe Arme, nicht *codon usage* optimiert) und #4 (Donor: doppelsträngige, linearisierte DNA, ohne homologe Arme, nicht *codon usage* optimiert) wurden CRISPR-Klone gewonnen, die in der Abbildung 3.2-1 & 2 graphisch visualisiert sind. Die Anzahl beider Phänotypen Pm^R grün und Pm^R blau, folgend als CRISPR-Klone oder Klone bezeichnet, ging in die Berechnung der Selektionsfrequenzen und Effizienzen (Kapitel 3.2 ff) ein.

KBE mit der Bezeichnung „ Pm^R gelb“ wuchsen zunächst als grüne KBE, verfärbten sich jedoch nach etwa 10 – 15 Tagen. Der Verlust der grünen Farbe ließ vermuten, dass die Zellen abgestorben waren. Dieser Verdacht erhärtete sich, nachdem ein Subkultivierung nicht gelang. Auch war es nicht möglich, eine Sequenzierung durchzuführen. Da die Zellen nicht

kultiviert werden konnten, konnte die für eine Isolation genomischer DNA benötigte Zellmasse nicht bereitgestellt werden. Denkbar wäre die Erklärung einer ungerichteten Insertion der Pm^R-Kassette in einem Bereich der genomischen DNA (gDNA), dessen *knock out* nach einer bestimmten Zeitspanne für die Zellen letal ist. Dies wird in Kapitel 4.1 vertieft. Der Anteil der KBE des Phänotyps Pm^R gelb an allen auf Selektionsmedium heranwachsenden Zellen der Transformationsansätze #1 - #9 (Donor: doppelsträngig oder plasmidär) machte ca. 30 % aus, unabhängig von der Anwesenheit des Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes. In den Transformationsansätzen #10 & #11, bei welchen einzelsträngige DNA als Donor eingesetzt wurde, lag der Anteil erstaunlich hoch: fast die Hälfte der erhaltenen Kolonien verfärbte sich nach 10 – 15 Tagen gelb. Die Anzahl der KBE „Pm^R gelb“ ging nicht in die Berechnungen der Selektionsfrequenzen oder Transformationseffizienzen (s. Kap. 3.4) ein, da es sich hierbei um nur-vorrübergehend-lebensfähige Zellen handelte.

Zur Visualisierung der verschiedenen Phänotypen der KBEs zeigt die Abbildung 3.2-1 eine beispielhafte Fotografie einer Paramomycin-haltigen Platte 15 d nach der Transformation mit dAK_11 (Plasmid, ohne homologe Bereiche, dAK_11) Ansatz #3 (A) & #2 (B).

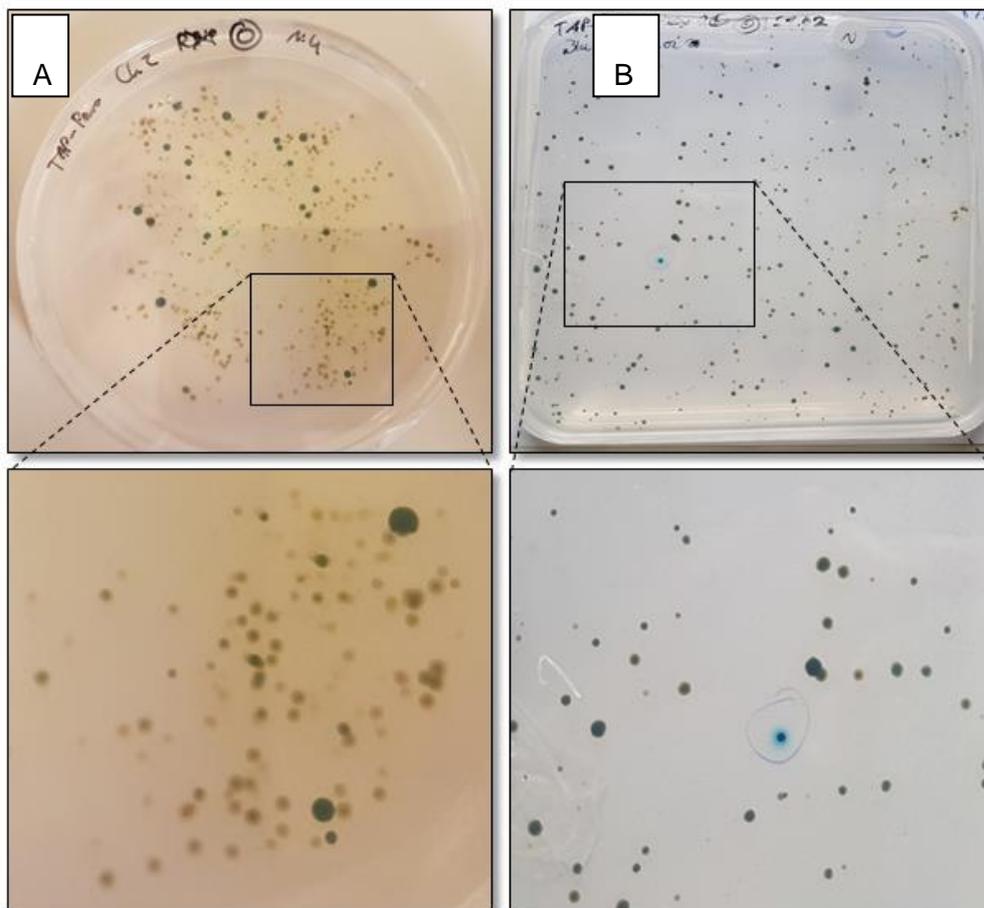


Abbildung 3.2-1: Foto der Transformanten auf Platten mit Selektionsmedium (TAP-Agar versetzt mit $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Paramomycin) von Ansatz #3 (A) & #2 (B), Donor: dAK_11 (Plasmid, ohne homologe Bereiche,

dAK_11); (A) Darstellung KBE „Pm^R gelb“ und „Pm^R grün“ mit Vergrößerung (unten); (B) Darstellung „Pm^R blau“ (als CRISPR-Klone identifiziert) „Pm^R grün“; beide Platten wurden mit dem XSO₄-Substrat besprüht und 1 d danach fotografiert; Alter der Platten nach dem Ausplattieren: 14 d.

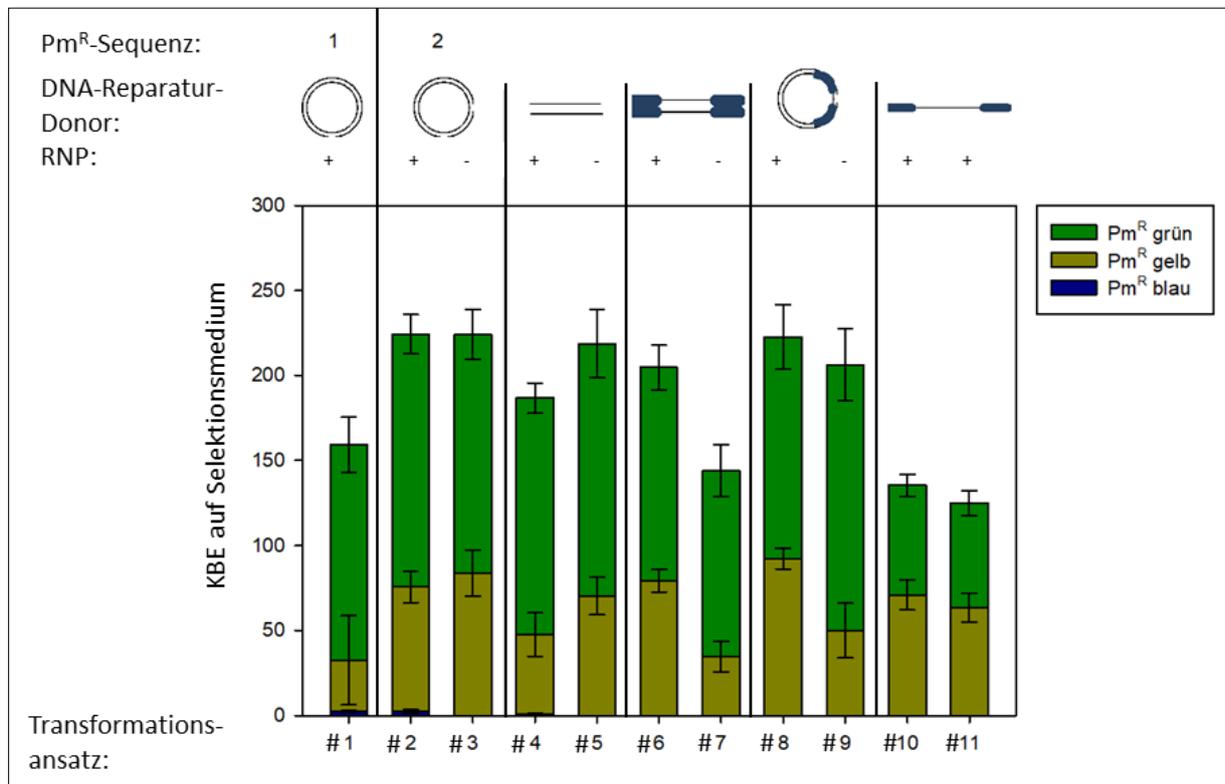


Abbildung 3.2-2: Darstellung der auf Selektionsmedium gewachsenen Kolonien nach Transformation mit unterschiedlichen DNA-Reparatur-Donoren. Pm^R steht für die Resistenz gegenüber Paromomycin, wobei Sequenz 1 *codon usage* optimiert ist, Sequenz 2 nicht *codon usage* optimiert; dick dargestellte Linien in den Piktogrammen der DNA-Reparatur-Donore für die Transformationsansätze #6 - #11 stellen zum SNRK2.2-Lokus homologe Bereiche dar; Balken: grün dargestellt sind die KBEs, welche vital auf Paromomycin wuchsen und im Farbttest negativ waren; gelb dargestellt sind die KBE, welche zunächst auf Paromomycin wuchsen, jedoch zwischen 10 – 15 d starben, Farbttest negativ; blau dargestellt sind KBE, welche auf Paromomycin wuchsen und im Farbttest positiv waren, in Folgenden auch als CRISPR-Klone bezeichnet. Die genaue Auflistung, der in den Transformationsansätzen #1 - #11 gewählten Donoren inkl. der Piktogramme ist in Tabelle 3-1 zu finden; Transformationsansatz #3, #5, #7 & #9 wurden als Negativkontrolle ohne RNP-Komplex transformiert; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, n = 3., Beschreibung des Farbttests siehe Kapitel 2.2.8.

Da in Abbildung 3.2-2 die Anzahl der interessanten „Pm^R blauen“ CRISPR-Klone kaum erkennbar ist, soll Abbildung 3.2-3 diese durch die Wahl der Achsenskalierung verdeutlichen. Zudem ist in der Abbildung 3.2-3 die Nomenklatur für die erhaltenen CRISPR-Klone aufgeführt.

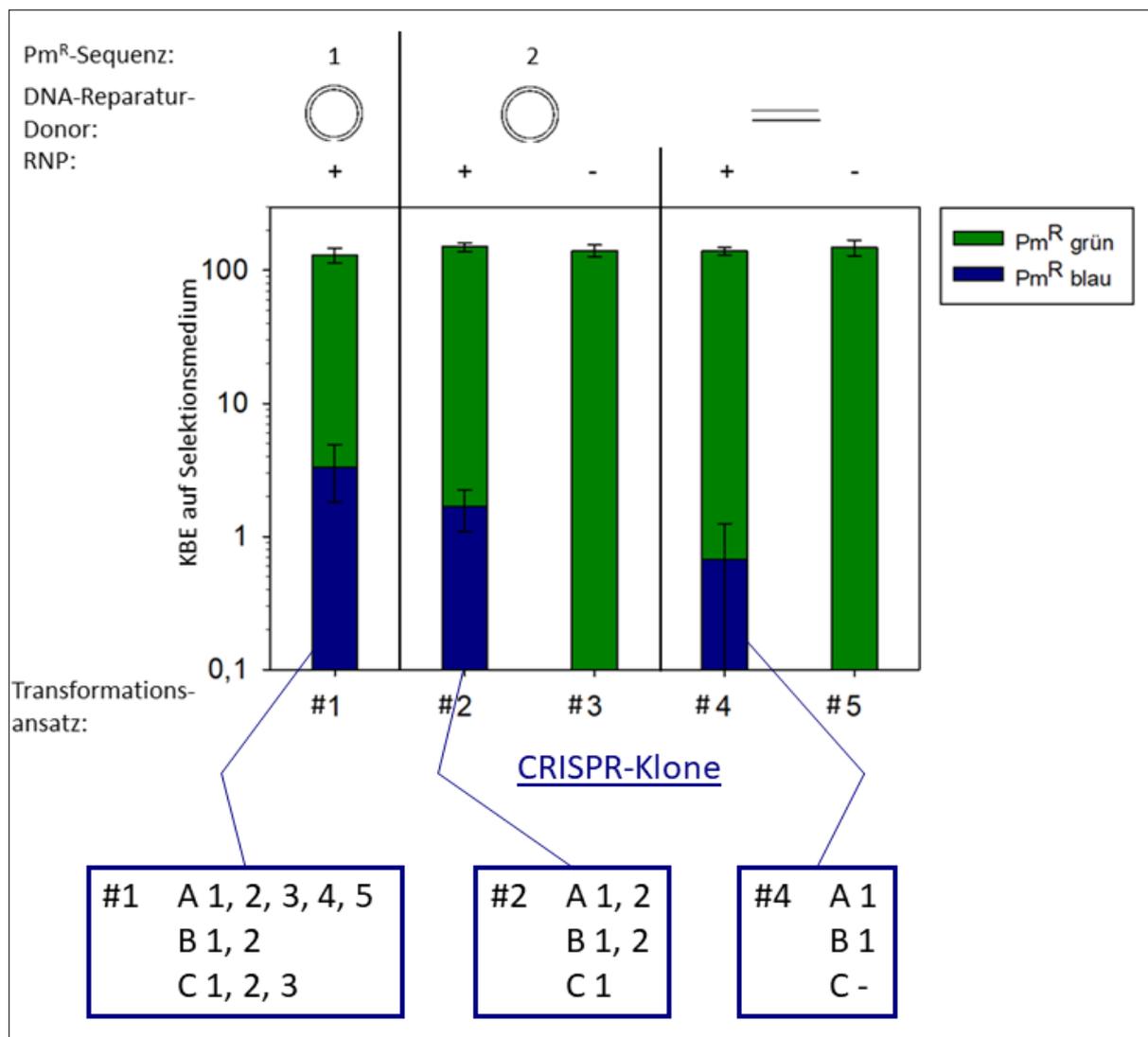


Abbildung 3.2-3: Halblogarithmische Darstellung der Transformanten Pm^R grün und Pm^R blau (CRISPR-Klone) der Transformationsansätze #1 - #5, wobei plasmidäre bzw. doppelsträngig linearisierte Donore ohne homologe Bereiche verwendet wurden. Die Abbildung beschränkt sich auf diese Ansätze, da für die anderen Versuche keine CRISPR-Klone gefunden werden konnten; Pm^R steht für die Resistenz gegenüber Paromomycin, wobei Sequenz 1 *codon usage* optimiert ist, Sequenz 2 nicht *codon usage* optimiert; grün dargestellt sind die KBEs, welche vital auf Paromomycin wuchsen und im Farbttest negativ waren; blau dargestellt sind KBE, welche auf Paromomycin wuchsen und im Farbttest positiv waren, in Folgenden auch als CRISPR-Klone bezeichnet. Die genaue Auflistung, der in den Transformationsansätzen #1 - #5 gewählten Donoren inkl. der Piktogramme ist in Tabelle 3-1 zu finden; Transformationsansatz #3 & #5 wurden als Negativkontrolle ohne RNP-Komplex transformiert; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, n = 3; Beschreibung des Farbttests siehe Kapitel 2.2.8, Die blauen Kästen zeigen die in der vorliegenden Arbeit genutzten Bezeichnungen der CRISPR-Klone. A, B & C stellen die einzelnen Triplikate dar.

In Ansatz #1 (Transformation mit dem Donor dAK_10, Plasmid, ohne homologe Bereiche, *codon usage* optimiert) konnten insgesamt in drei Ansätzen (A, B, C) zehn CRISPR-Klone gefunden werden. In Ansatz #2 (Transformation mit Donor dAK_11, Plasmid, ohne homologe Bereiche, nicht *codon usage* optimiert) wurden insgesamt 5 CRISPR-Klone in drei Ansätzen

gefunden. Außerdem konnten in Ansatz #4, bei welchem die Transformation der linearisierten, doppelsträngigen Pm^R-Kassette (dAK_13) erfolgte, insgesamt in drei Ansätzen zwei CRISPR-Klone nachgewiesen werden. Ansätze #1, #2 und #4 wurden mit dem RNP-Komplex transformiert. In den Ansätzen ohne RNP-Komplex (Negativ-Kontrollen) waren erwartungsgemäß keine Farbtest-positiven Transformanten nachweisbar (Abbildung 3.2-3, #3, #5).

Basierend auf der Auszählung der Kolonien-bildenden-Einheiten der Gruppen „Pm^R-grün“ und Pm^R-blau“ und der für jeden Transformationsansatz eingesetzten Zellzahl von $3 \cdot 10^6$ Zellen konnte die Selektionsfrequenz berechnet werden (Abbildung 3.2-4, Tabelle 3.2-1). Bei dieser Berechnung wird vorausgesetzt, dass sich alle eingesetzten Zellen im Übergang der G1 zu S-Zellzyklusphase befanden und es sich bei der jeweiligen Algenkultur um eine Suspension homogen synchronisierter Zellen handelt (siehe Kapitel 2.2.2).

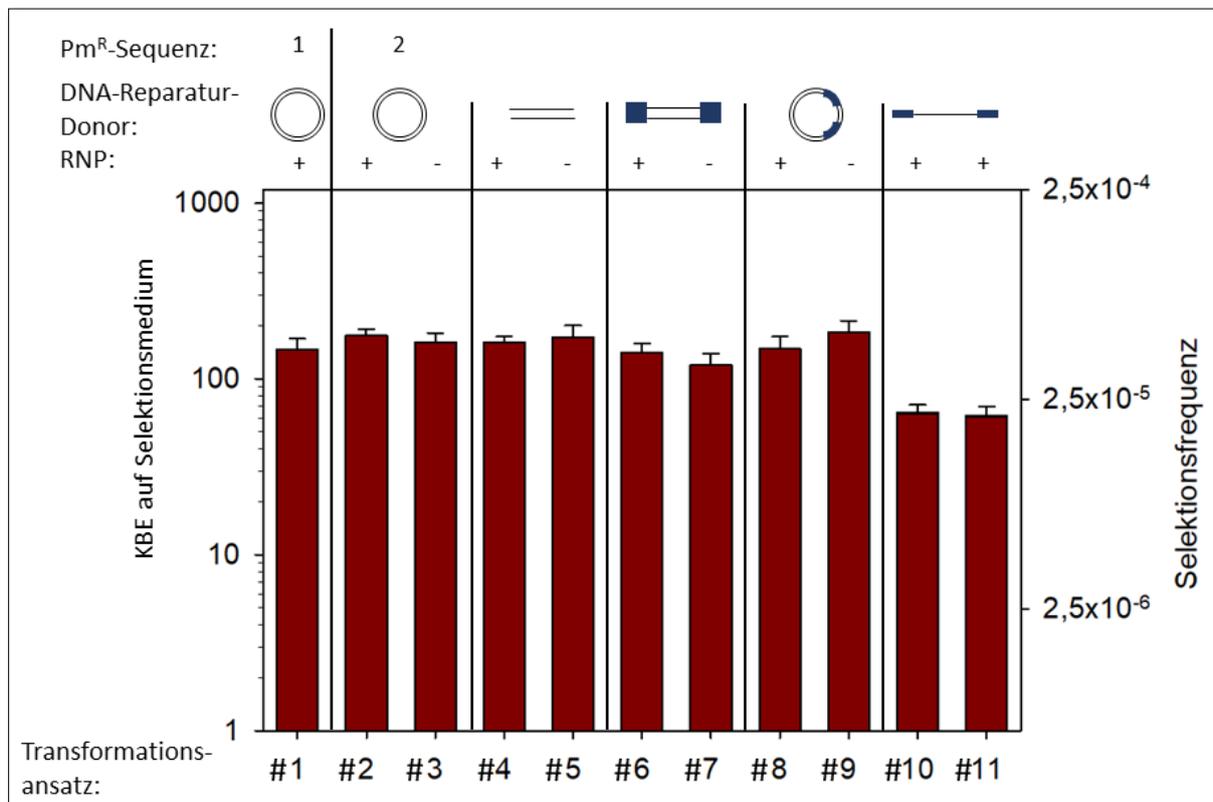


Abbildung 3.2-4: Halblogarithmische Darstellung der auf Selektionsmedium gewachsenen Kolonien sowie der Selektionsfrequenz bezogen auf die Gesamtzellanzahl bei der Transformation. Pm^R steht für die Resistenz gegenüber Paromomycin, wobei Sequenz 1 *codon usage* optimiert ist, Sequenz 2 nicht *codon usage* optimiert; Die genaue Auflistung, der in den Transformationsansätzen #1 - #11 gewählten Donoren inkl. der Piktogramme ist in Tabelle 3-1 zu finden; Transformationsansatz #3, #5, #7 & #9 wurden als Negativkontrolle ohne RNP-Komplex transformiert; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, n = 3.

Die Selektionsfrequenzen der Ansätze, bei denen mit doppelsträngigen Donoren gearbeitet wurde liegen zwischen $3,64 \cdot 10^{-5}$ und $5,01 \cdot 10^{-5}$ (Mittelwert $4,55 \cdot 10^{-5}$). Diese Ergebnisse liegen

nur geringfügig unter den Werten der Literatur ($7 - 12 \cdot 10^{-5}$) [Greiner et al. 2017]. Die Werte der Ansätze, bei denen mit einzelsträngigen DNA-Reparatur-Donoren gearbeitet wurde, sind mit einem Durchschnittswert von $2,1 \cdot 10^{-5}$ um den Faktor 2 geringer.

Vergleichbare Werte wurden für die Selektionsfrequenzen der Transformationsansätze mit und ohne RNP-Komplex ermittelt. Wie erwartet ist die Selektionsfrequenz ist demnach unabhängig von diesem Parameter. Diese Aussage lässt sich durch eine ähnliche Anzahl an „Pm^R-grün“ KBE (ungerichtete Insertion) in allen Ansätzen bestätigen. Zudem kann festgestellt werden, dass unter den gewählten Bedingungen einzelsträngige DNA-Reparatur-Donoren ausschließlich zur ungerichteten Insertion führten. Die CRISPR-Cas9 vermittelte Modifizierung von *C. reinhardtii* ist, basierend auf den in diesem Kapitel beschriebenen Daten ein relativ seltener Prozess. Die weitere Charakterisierung der CRISPR-Klone, die das Ergebnis der gerichteten Insertion sind, wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Tabelle 3.2-1: Anzahl und Phänotyp der Transformanten und Selektionsfrequenz der Ansätze mit verschiedenen DNA-Reparatur-Donoren; „Pm^R grün“ wuchs auf Paromomycin, Farbtest negativ; „Pm^R gelb“ wuchs auf Paromomycin und starb binnen 10 – 15 d ab, Farbtest negativ; „Pm^R blau“ wuchs auf Paromomycin, Farbtest positiv, als CRISPR-Klone identifiziert; n = 3.

| # | R N P | Name | Kürzel | Pm^R grün Anzahl KBE*, Wachstum auf Selektions- medium, Farbtest negativ Ungerichtete Insertion der Resistenz- kassette | Pm^R gelb Anzahl KBE*, Wachstum auf Selektions- medium für 10- 15 d, danach Zelltod, Farbtest negativ | Pm^R blau Anzahl KBE*, Wachstum auf Selektions- medium, Farbtest positiv Gerichtete Insertion der Resistenz- kassette | Selektions- frequenz Summe (KBE Pm ^R grün + KBE Pm ^R blau) / $3 \cdot 10^6$ |
|----|-------------|----------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | + | pPH75 | dAK_1 0 | 126,7 ± 16,2 | 30 ± 26,2 | 3,33 ± 1,53 | $4,33 \cdot 10^{-5} \pm 0,54 \cdot 10^{-5}$ |
| 2 | + | pPH114 | dAK_1 1 | 148,67 ± 11,50 | 73,33 ± 9,29 | 1,67 ± 0,58 | $5,01 \cdot 10^{-5} \pm 0,38 \cdot 10^{-5}$ |
| 3 | - | pPH114 | dAK_1 1 | 140,33 ± 14,74 | 83,67 ± 13,58 | 0 | $4,68 \cdot 10^{-5} \pm 0,49 \cdot 10^{-5}$ |
| 4 | + | M13-Amplikon pPH114 | dAK_1 3 | 139 ± 9 | 47 ± 12,77 | 0,67 ± 0,58 | $4,66 \cdot 10^{-5} \pm 0,30 \cdot 10^{-5}$ |
| 5 | - | M13-Amplikon pPH114 | dAK_1 3 | 148,33 ± 20,03 | 70,33 ± 11,02 | 0 | $4,94 \cdot 10^{-5} \pm 0,67 \cdot 10^{-5}$ |
| 6 | + | pUC57_dsOD N7 | dAK_7 | 125,33 ± 13,01 | 79,33 ± 6,66 | 0 | $4,18 \cdot 10^{-5} \pm 0,43 \cdot 10^{-5}$ |
| 7 | - | pUC57_dsOD N7 | dAK_7 | 109,33 ± 15,04 | 34,67 ± 9,07 | 0 | $3,64 \cdot 10^{-5} \pm 0,50 \cdot 10^{-5}$ |
| 8 | + | M13-Amplikon pUC57_dsOD N7 | dAK_1 2 | 130,33 ± 19 | 92,33 ± 6,11 | 0 | $4,34 \cdot 10^{-5} \pm 0,63 \cdot 10^{-5}$ |
| 9 | - | M13-Amplikon pUC57_dsOD N7 | dAK_1 2 | 156,33 ± 21,22 | 50 ± 16,09 | 0 | $5,21 \cdot 10^{-5} \pm 0,71 \cdot 10^{-5}$ |
| 10 | + | ssODN8 | dAK_8 | 64,33 ± 6,5 | 71 ± 8,89 | 0 | $2,14 \cdot 10^{-5} \pm 0,21 \cdot 10^{-5}$ |
| 11 | + | ssODN9 | dAK_9 | 61,67 ± 7,5 | 63,33 ± 8,39 | 0 | $2,06 \cdot 10^{-5} \pm 0,25 \cdot 10^{-5}$ |

*) Die Anzahl spiegelt das arithmetische Mittel aus drei Versuchen wider.

3.3 Bestimmung der Selektionseffizienz

Im Gegensatz zur Selektionsfrequenz, die die Häufigkeit einer Insertion der Resistenzvermittelnden Zielsequenz (Pm^R-Kassette, vermittelt die Resistenz gegen Paromomycin) anzeigt, beschreibt die Selektionseffizienz den Erfolg der Editierung im gewünschten Lokus [Ferenczi et al., 2017]. Ziel der vorliegenden Arbeit war nicht nur die Insertion einer Zielsequenz an sich, sondern vor allem die Einführung einer präzisen Insertion am Ziellokus. Bezugsgröße ist hierbei nicht, wie in den vorangegangenen Kapiteln, die Gesamtzellzahl im Transformationsansatz, sondern die Zahl der vitalen Zellen (siehe Kapitel 3.2). Mögliche Mehrfachinsertionen und der Modus der Editierung (z.B. Einführung von Indels oder die Vollständigkeit der Zielsequenz) werden in den Kapiteln 3.5 & 3.6 dargestellt, in den Kapiteln 4.1.3 sowie 4.3 diskutiert.

Um die Selektionseffizienz zu berechnen, wurde die Anzahl an CRISPR-Klonen (auch als Farbtest-positive Kolonien oder als „Pm^R blau“ bezeichnet, Übersicht siehe Abbildung 3.2-3) durch die Anzahl an lebensfähigen KBE (siehe Kapitel 3.1) dividiert (Kapitel 2.2.12). Die Selektionseffizienzen der Transformationsansätze #1 – 5 (Ansatz #1, 2 & 3: plasmidär und Ansatz #4 & 5: linear, doppelsträngig; jeweils ohne homologe Bereiche) sind in Tabelle 3.3-1 dargestellt.

In den Transformationsansätzen #6 – 11, in denen ein plasmidärer, doppel- sowie einzelsträngiger, mit homologen Bereichen versehender Reparatur-Donor eingesetzt wurde, konnten keine Farbtest-positiven Klone gefunden werden. Deshalb beschränkt sich die Tabelle 3.3-1 auf die Transformationsansätze #1 – 5, in denen plasmidäre bzw. lineare doppelsträngige Reparatur-Donore ohne homologe Bereiche genutzt wurden. Neben der Selektionseffizienz sind die Anzahl der lebensfähigen KBE nach der Transformation auf nicht-selektivem Medium (siehe Kapitel 3.1, und die Anzahl der CRISPR-Klone (Pm^R blau) dargestellt, da diese zur Berechnung der Selektionseffizienz benötigt werden. Da die Werte der Vitalität (s. Kapitel 3.1) zwischen den Transformationsansätzen ähnlich sind, sind die Ergebnisse untereinander direkt vergleichbar.

Für den Transformationsansatz #1 wurde eine Selektionseffizienz von 0,024 % berechnet. Bei diesem Ansatz wurde der Donor dAK_10, welcher eine *codon usage* optimierte Pm^R-Sequenz codiert, transformiert. Mit einer Selektionseffizienz von 0,012 % liegt der Transformationsansatz #2 um die Hälfte unter diesem Wert. Auch im Transformationsansatz #2 wurde mit plasmidärer DNA gearbeitet, jedoch mit Reparatur-Donor dAK_11, dessen Pm^R-Sequenz nicht *codon usage* optimiert ist. Für den Transformationsansatz #4 wurde eine Selektionseffizienz von 0,0046 % ermittelt. Ein Wert, welcher 2,6 bzw. 5fach unter den Werten

aus Transformationsansatz #1 & #2 liegt. In diesem Ansatz wurde mit einer linearisierten, doppelsträngigen DNA mit einer nicht-*codon usage* optimierten Sequenz gearbeitet.

In diesem Kapitel wurde untersucht, mit welchem Ansatz eine auf den targetierten Locus gezogene Präzision der Insertion möglich ist. Die Nutzung einer *codon usage*-optimierten Sequenz, welche doppelsträngig und plasmidär ist, brachte hierfür mit einer Selektionseffizienz von 0,024 % das beste Ergebnis. Die Nutzung von Donoren mit homologen Bereichen führte hingegen zu keinem Transformationserfolg (Transformationsansatz #6 – 11). Dies lässt den Rückschluss zu, dass der Weg der homologen Rekombination (HR) nicht erfolgte. Gerade deshalb ist die Nutzung der Nuklease Cas so attraktiv: ihre Nutzung ermöglicht vom Insertionsmechanismus unabhängig eine Präzision des Insertionsortes im Genom des Zielorganismus.

Tabelle 3.3-1: Darstellung der in dieser Arbeit ermittelten Selektionseffizienzen, n = 3, A, B & C repräsentieren die unterschiedlichen Ansätze des Triplikats, dargestellt sind die Werte und die Standardabweichung; die Klonbezeichnungen sind in Abbildung 3.2-3 als Übersicht dargestellt; genutzte Donore (siehe Tabelle 3-1 in Kapitel 3) in Transformationsansatz #1: Plasmid, *codon usage* optimiert, ohne homologe Arme, Transformationsansatz #2: Plasmid, nicht *codon usage* optimiert, ohne homologe Arme sowie Transformationsansatz #4: linearisiert, doppelsträngig, nicht *codon usage* optimiert, ohne homologe Arme; alle weiteren Transformationsansätze sind nicht dargestellt, da dabei keine CRISPR-Klone generiert werden konnten, Transformationsansatz #3, #5, #7 & #9 wurden ohne RNP-Komplex transformiert und dienten als Negativkontrolle, in Transformationsansatz #4 konnten in Versuch C keine CRISPR-Klone gefunden werden, weshalb die Standardabweichung in diesem Fall auffällig hoch ist.

| | SNRK2.2-Lokus (vorliegende Arbeit) | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| DNA-Reparatur-Donor | dAK_10 | dAK_11 | dAK_13 |
| Piktogramm |  |  |  |
| Transformationsansatz | #1 | #2 | #4 |
| Arithmetisches Mittel der Anzahl der lebensfähigen KBE nach der Transformation auf nicht-selektivem Medium (siehe Kapitel 3.1) | $\bar{x} = 13.988,67 \pm 812,9$ | $\bar{x} = 14.300 \pm 2165,27$ | $\bar{x} = 14.586,67 \pm 1146,53$ |
| CRISPR- Klone | #1 A1, 2, 3, 4, 5 B1, 2 C1, 2, 3 $\bar{x} = 3,33 \pm 1,53$ | #2 A1, 2 B1, 2 C1 $\bar{x} = 1,67 \pm 0,58$ | #4 A1 B1 $\bar{x} = 0,67 \pm 0,58$ |
| Selektionseffizienz [%] | 0,024 ± 0,01 | 0,012 ± 0,004 | 0,0046 ± 0,0039 |

3.4 Bestimmung der Targeteffizienz

Neben der Selektionseffizienz (siehe Kapitel 3.3) wurde als Parameter zur Einordnung der Präzision am targetierten Locus im Kerngenom von *C. reinhardtii* die Targeteffizienz ermittelt. Die Targeteffizienz („*targeting efficiency*“) beschreibt den Erfolg der Editierung im gewünschten Locus und setzt die Anzahl der CRISPR-Klone ins Verhältnis zu der Gesamtanzahl aller Klone, welche auf Selektionsmedium („*selected colonies*“) wachsen. ([Baek et al., 2016; Greiner et al., 2017]). Im Gegensatz dazu wurde bei der Berechnung der Selektionseffizienz (siehe Kapitel. 3.3) die Anzahl an lebensfähigen KBE als Bezugsgröße genutzt. Diese erneute Verrechnung der Anzahl an CRISPR-Klonen ist darin begründet, dass in der Literatur der Effizienzbegriff nicht einheitlich verwendet wird. Um eine Einordnung der in dieser Arbeit generierten Daten zu ermöglichen, wurden sowohl die Selektionseffizienz als auch die in diesem Kapitel beschriebenen Targeteffizienz berechnet. Die Berechnung ist in Kapitel 2.2.12 beschrieben. Die Sequenzierergebnisse zur Untersuchung des Ortes und des Modus der Editierung (Einführung von Indels oder die Vollständigkeit der Zielsequenz) sind in Kapitel 3.5 & 3.6 bei der Untersuchung der Reparatur-Modus-Effizienz und der Untersuchung der Insertionsfrequenz Southern Blot dargestellt.

Tabelle 3.4-1 zeigt die Werte der Targeteffizienz der Transformationsansätze #1, #2 und #4. Dabei wurde mit plasmidären oder linearisierten doppelsträngigen Donoren ohne homologe Bereiche gearbeitet. Die Betrachtung der anderen Transformationsansätze entfällt auch hier, da es dabei zu keiner Entstehung von CRISPR-Klonen kam.

Der Transformationsansatz #1, bei dem ein Plasmid verwendet wurde, welches eine für *Chlamydomonas codon usage* optimierte Insertionssequenz enthielt, wurde die höchste Targeteffizienz von $2,58 \pm 1,18$ % erzielt. Bei der Verwendung des Plasmids, welcher die nicht *codon usage* optimierte Insertionssequenz trägt, ist der Wert der Targeteffizienz um den Faktor 2,3 verringert und beträgt $1,11 \pm 0,38$ %. Mit $0,48 \pm 0,41$ % wurde der kleinste Wert für die Targeteffizienz bei Transformationsansatz #4 gefunden. Die Verwendung der linearisierten Pm^R-Kassette ist 5,4fach bzw. 2,3fach weniger effizient als die Verwendung der Plasmide (*codon usage* optimiert / nicht *codon usage* optimiert). Es stellte sich also heraus, dass Transformationsansatz #1 am effizientesten funktionierte, die Transformationsansätze #2 und #4 wiesen eine entsprechend geringere Effizienz auf. Diese Tendenz konnte für die Selektions- und Targeteffizienz gefunden werden, da hierbei die gleiche Anzahl an CRISPR-Klonen verrechnet wurde. In Kapitel 3.5 wird der Fokus auf den Modus der Insertion gerichtet, wobei mit Hilfe von Sequenzierdaten die Doppelstrangbruchsstelle und die Insertionssequenz untersucht wurden.

Tabelle 3.4-1: Darstellung der in dieser Arbeit ermittelten Targeteffizienzen, $n = 3$, A, B & C repräsentieren die unterschiedlichen Ansätze des Triplikats, dargestellt sind die Werte und die Standardabweichung; die Mutantenbezeichnungen sind in Abbildung 3.2-3 als Übersicht dargestellt; genutzte Donore (siehe Tabelle 3-1 in Kapitel 3) in Transformationsansatz #1: Plasmid, *codon usage* optimiert, ohne homologe Arme, Transformationsansatz #2: Plasmid, nicht *codon usage* optimiert, ohne homologe Arme sowie Transformationsansatz #4: linearisiert, doppelsträngig, nicht *codon usage* optimiert, ohne homologe Arme; alle weiteren Transformationsansätze sind nicht dargestellt, da dabei keine CRISPR-Klone generiert werden konnten, Transformationsansatz #3, #5, #7 & #9 wurden ohne RNP-Komplex transformiert und dienten als Negativkontrolle, in Transformationsansatz #4 konnten in Versuch C keine CRISPR-Klone gefunden werden, weshalb die Standardabweichung in diesem Fall auffällig hoch ist.

| | SNRK2.2-Lokus (vorgelegte Arbeit) | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DNA-Reparatur-Donor | dAK_10 | dAK_11 | dAK_13 |
| Piktogramm |  |  |  |
| Transformationsansatz | #1 | #2 | #4 |
| Arithmetisches Mittel der Kolonien auf Selektionsmarker, siehe Tabelle 3.2-1, Summe aus Pm ^R grün & blau | $\bar{x} = 130,03 \pm 16,2$ | $\bar{x} = 150,34 \pm 11,5$ | $\bar{x} = 139,67 \pm 9$ |
| CRISPR-Klone | #1 A1, 2, 3, 4, 5 B1, 2 C1, 2, 3 | #2 A1, 2 B1, 2 C1 | #4 A1 B1 |
| | $\bar{x} = 3,33 \pm 1,53$ | $\bar{x} = 1,67 \pm 0,58$ | $\bar{x} = 0,67 \pm 0,58$ |
| Targeteffizienz [%] | $2,58 \pm 1,18$ | $1,11 \pm 0,38$ | $0,48 \pm 0,41$ |

Eine Insertion über den Mechanismus der homologen Rekombination (HR) wurde nicht beobachtet (Transformationsansätze #6 - #11). Dieses Ergebnis macht die Nutzung der Cas in *C. reinhardtii* so attraktiv. Die Cas9 im Komplex mit der *guiding* RNA bindet ihren targetierten Lokus im Genom und die im Transformationsansatz angebotene Donor-DNA wird an dieser Stelle eingebaut, die entsprechenden Effizienzen wurden in diesem Kapitel berechnet. Auch wenn der Einbau selbst nicht über den Mechanismus der HR läuft, ist eine Präzision der Insertion trotzdem durch die Nutzung der Cas gegeben. Dies ist bei den klassischen Insertionsmethoden nicht der Fall. Die in der vorliegenden Arbeit erzeugten blauen Kolonien (Pm^R blau, auch als CRISPR-Klone bezeichnet) repräsentieren diese Präzision, die grünen Kolonien (Pm^R grün) hingegen zeigen, wie unpräzise eine Insertion generell sein kann. Da es bei der Anzahl an grünen Kolonien, die in Transformationsansätzen mit und ohne RNP-Komplex erzielt wurden kaum Unterschiede gibt (Abbildung 3.2-2), ist zu vermuten, dass es sich hierbei vor allem um *random* Insertionen handelt. Diese Insertionen passieren ohne das Zutun der Cas und stellen den klassischen ungerichteten Insertionserfolg dar. Auch *Off-target*-Effekte der Cas können hier eine Rolle spielen, dann aber wäre ein deutlicherer Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne RNP zu erwarten gewesen.

3.5 Bestimmung der Reparatur-Modus-Effizienz zur Quantifizierung eines präzisen und vollständigen Insertionsereignisses

Um den Erfolg der Genstilllegung (*knock out*) zu beziffern und um zusätzlich die Ereignisse der gezielten Insertion eines Gens an der gewünschten Stelle im Genom zu beschreiben, wird im Folgenden der Begriff der Reparatur-Modus-Effizienz (RME) neu eingeführt. Der Begriff der Reparatur-Modus-Effizienz ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. In der Literatur liegt der Fokus vor allem auf dem *knock out* des targetierten Locus. Zur Quantifizierung von *knock outs* reichen die Selektions- & Targeteffizienz aus und wurden auch in der vorliegenden Arbeit berechnet (s. 3.3 und 3.4). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch neben der Präzision der Schnitt- und damit der Insertionsstelle im Genom von *C. reinhardtii* auch die Vollständigkeit der zu inserierende Sequenz untersucht werden sollte, wird ein Parameter dafür benötigt: RME. Die RME berechnet sich, ähnlich wie die Targeteffizienz (siehe Kapitel 2.2.12), jedoch gehen anstelle der Anzahl aller CRISPR-Klone (Pm^R blau) nur jene CRISPR-Klone in die Berechnung ein, die den folgenden, zusätzlichen Kriterien genügen:

- (i) Klone mit Schnittpräzision der Cas9 am targetierten Locus (*SNRK2.2*, dessen Mutation führt zu einer unregulierten Produktion der Arylsulfatase, welche mit Hilfe einer Farbreaktion im *screening* nachgewiesen werden kann, siehe Kapitel 1.1.3.3), dies ist bereits mit dem Begriff der Targeteffizienz abgegolten;

zusätzlich dazu: (ii) Klone mit vollständig inserierter Resistenzkassette (RME 1, siehe Tabelle 3.5.3-2) und außerdem ohne das dabei Fragmente des Vektorrückgrades oder Fragmente unbekannter Herkunft zusätzlich eingebaut würden (RME 2, siehe Tabelle 3.5.3-2)

In den folgenden Abschnitten 3.5.1 und 3.5.2 werden zunächst die Ergebnisse der Sequenzierungen dargestellt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.5.3 zusammengefasst. Die berechneten Werte für die RME finden sich in Tabelle 3.5.3-2.

Um die jeweilige Reparatur-Modus-Effizienz der Transformationsansätze #1, #2, #4 der vorliegenden Arbeit zu bestimmen, wurden alle 17 CRISPR-Klone (siehe Abbildung 3.2-3) im *SNRK2.2*-Locus sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung werden im Folgenden u.a. als Sequenzabgleiche mit der WT (wildtyp)-Sequenz dargestellt. Die WT-Sequenz wurde der Datenbank NCBI entnommen (GeneBank assembly accession: GCA_000002595.3; Link siehe Literaturverzeichnis). Die dort hinterlegte Sequenz entstammt dem Sequenzierprojekt des DOE Joint Genome Institute und wird regelmäßig aktualisiert. Im DOE-Projekt wurde der Stamm CC-503 cw92 (mt+) sequenziert. Der in der vorliegenden Arbeit für die Transformation

verwendete Stamm CC-125 (mt+) ist, wie in der Einleitung unter 1.1.2 beschrieben, der Ausgangsstamm für viele mutierte Organismen; darunter CC-503 cw92 (mt+). Eine Probe der genomischen DNA (gDNA) von CC-125 wurde nach den Angaben in Kapitel 2.2.6 des Material- und Methodenteils isoliert und von einem Dienstleister sequenziert. In Abbildung 3.5-1 ist das Ergebnis des Sequenzabgleichs (*alignment*) dargestellt. Damit sollte zunächst sichergestellt werden, dass die, in der Datenbank hinterlegte Sequenz, als Basis für die *alignments* mit den CRISPR-Klonen dienen kann.

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 3.5.1-1 – 3.5.1-6) weisen einen ähnlichen Aufbau auf, der vorab erklärt werden soll:

Im oberen Bereich der Abbildungen (A) ist ein Ausschnitt aus dem Genom von *C. reinhardtii* gezeigt. Es handelt sich dabei um den *SNRK2.2*-Lokus. Der DNA-Doppelstrang wird als schwarze Doppel-Linie visualisiert. Die Exon-Bereiche sind als hellblaue Balken gekennzeichnet während intronische Bereiche als gestrichelte Linie dargestellt sind. An den *SNRK2.2*-Lokus schließt sich eine codierende Sequenz an, welche als „CHLREDRAFT_194634“ bezeichnet wurde („CHL“: *Chlamydomonas*, „RE“: *reinhardtii*, „Draft“: Entwurf; die Zahlenfolge wurde von der Datenbank NCBI vergeben). Es handelt sich dabei um einen Genabschnitt, welcher als codogen eingestuft wird, das hypothetische Protein aber noch unbekannt ist. Pfeilrichtungen geben die Leserichtung an. Der dunkelrote Balken repräsentiert Sequenzabschnitte, bei denen das *alignment* erfolgreich war. Dabei stimmt die bei der Sequenzierung gefundene Nukleinbasenabfolge mit der erwarteten Nukleinbasenabfolge überein. Außerdem sind die in der vorliegenden Arbeit genutzten Primerbindestellen veranschaulicht. Diese sind in lila und mit der Nummerierung prAK_# versehen. Die beiden äußeren Primer (z.B. in Abb. 3.5-1 die Primer prAK_84 und prAK_50) wurden für die lokusspezifische PCR genutzt, das dabei entstandene Fragment wurde als Templat für die Sequenzierung mit dem dritten Primer (z. B. in Abb. 3.5-1 der Primer prAK_51) verwendet. Alle verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.5 in Tabelle 2.1.5-1 aufgelistet.

Der Teil (B) der jeweiligen Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt im *SNRK2.2*-Lokus, wobei das Ergebnis des *alignments* abgebildet wird. Auch hier ist ein, diesmal sehr viel kleinerer Ausschnitt des *SNRK2.2*-Lokus gezeigt, diesmal auf Sequenzebene. Die Bindestelle der *guiding* RNA (sgRNA), welche unter Zuhilfenahme des *online tools* CRISPR-P (siehe Kapitel 2.2.1) unter Berücksichtigung möglicher *Off-targets* gewählt wurde, und das PAM (*protospacer adjacent motif*) sind als violett-farbene bzw. schwarze Balken präsentiert. Die vorgesehene Schnittstelle der Cas9 ist mit einem kleinen Pfeil zwischen der dritten und vierten Base nach dem PAM in Leserichtung markiert. Direkt darunter (C) findet sich die Darstellung der Sequenz, die im jeweiligen Experiment erhalten wurde, in Abbildung 3.5-1 als „WT

SNRK2.2.prAK_51“ benannt. Beispielhaft ist hier ein Ausschnitt des Elektropherogrammes aufgeführt, welches die Qualität des *alignments* zeigt. Gibt es keine Signalüberlagerungen der Amplituden, spricht das für eine hohe Qualität. Im anderen Fall wäre eine Auswertung der Sequenzdaten nicht möglich.

Die Sequenzierung eines 1428 bp langen Stückes des *SNRK2.2*-Lokus mit den Primern prAK_84 und prAK_50 zeigte, dass beide Sequenzen identisch sind. Damit wurde bestätigt, dass die in der Datenbank hinterlegten Sequenzdaten für den Stamm CC-503 cw92 (mt+) im *SNRK2.2*-Lokus mit dem, in der vorliegenden Arbeit verwendeten, Stamm CC-125 (mt+) übereinstimmt. Im Folgenden wird deshalb diese Sequenz als „WT“ benannt.

Die z.T. kommerziell erworbenen und z.T. selbst produzierten DNA-Reparatur-Donoren (siehe Kapitel 2.2.6 im Material- und Methodenteil) wurden zum Zwecke der Sequenzvalidierung ebenfalls sequenziert. Alle Donoren entsprachen dabei der erwarteten Sequenz (Sequenzabgleiche nicht gezeigt). Im Ordner „2_Validierung der WT-Sequenz und der DNA-Reparatur-Donoren“ des digitalen Anhangs sind die mit SnapGene erstellten Sequenzabgleiche (*alignments*) als „dna“-files hinterlegt, die originalen Sequenzierdaten sind als „ab1-files“ ebenfalls in diesem Ordner geführt. Im Kapitel 8.2 können Hinweise für das Abrufen der Sequenzabgleiche gefunden werden.

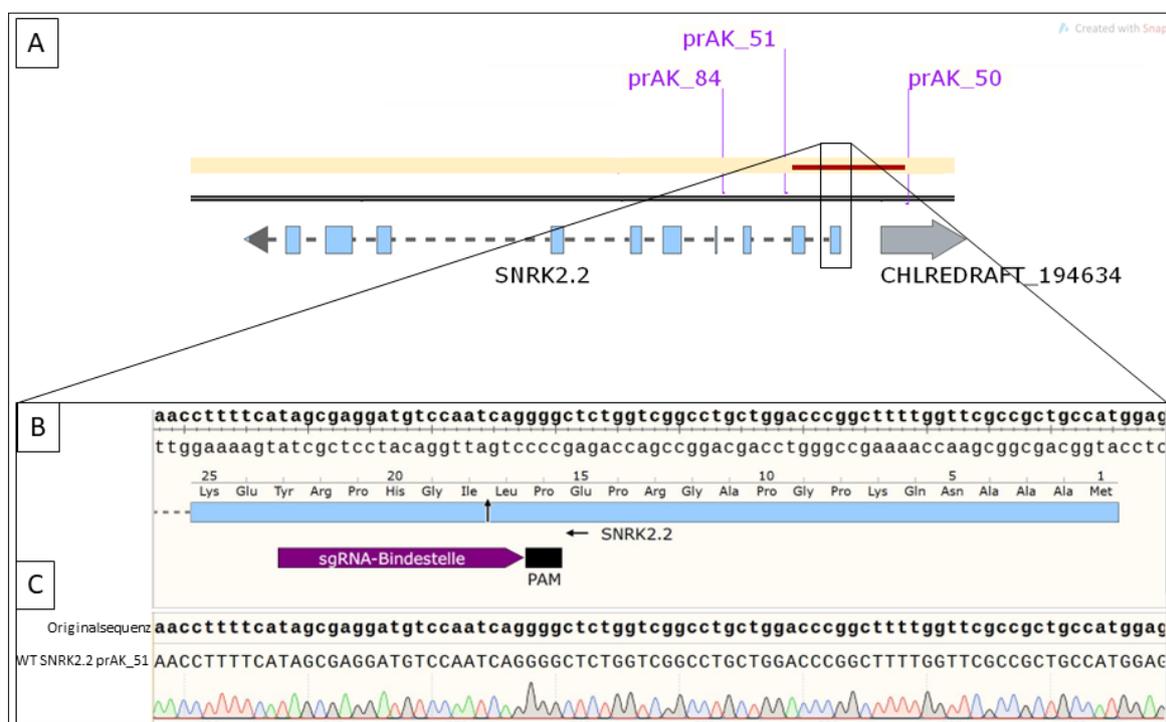


Abbildung 3.5-1: Darstellung des Sequenzabgleiches der in der NCBI-Datenbank hinterlegten WT-Sequenz für *C. reinhardtii* (CC-503 cw92 mt+) und der gDNA des in dieser Arbeit genutzten CC-125 (mt+) Stammes im *SNRK2.2*-Lokus. Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_84 & 50; Sequenzierprimer: prAK_51. A: Im oberen Teil der Abbildung ist eine Darstellung über den gesamten Locus

gewählt, wobei der dunkelrote Bereich zw. prAK_50 & 51 einen identische Sequenzabschnitt präsentiert; Primer sind als lila-farbene Linien gekennzeichnet, der graue Balken repräsentiert eine dem SNRK.2.2-Lokus benachbarte Sequenz CHLREDRAFT_194634.; B: im unteren Bereich der Abbildung ist ein repräsentativer Ausschnitt gezeigt; hellblaue Balken repräsentieren exonische Bereiche, eine gestrichelte Linie zeigt intronische Bereiche, die sgRNA_Bindestelle ist durch einen pflaumenfarbenen Balken gezeigt, das PAM durch einen schwarzen Balken, Pfeilrichtungen geben die Leserichtung an. C: zeigt die zu vergleichenden Sequenzen mit dem entsprechenden Ausschnitt des Elektropherogrammes, welches als Qualitätskontrolle dient. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 2, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „WT gDNA SNRK2.2-Lokus NCBI.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene.

3.5.1 Untersuchung der Doppelstrangbruchstelle mittels Sanger-Sequenzierung

Die CRISPR-Cas9 erzeugt Doppelstrangbrüche (DSB) an der Stelle der genomischen DNA des Zielorganismus, für die die *guiding* RNA designed wurde. Wie in der Einleitung (siehe Kapitel 1.1.2) erläutert wurde, kann es beim c-NHEJ (*canonical non-homologous end joining*) Reparaturmechanismus zu Fehlern kommen. Der c-NHEJ ist definiert als ein Reparaturmechanismus, bei welchem eine direkte Ligation der Bruchenden stattfindet. Jedoch ist nicht jeder DSB gleich, es können verschiedene Überhang-Polaritäten und –Längen oder chemische Modifikationen der Nachbarnukleotide das chemische Milieu beeinflussen. Sind die Überhänge vollständig kompatibel zueinander, ist die direkte Ligation möglich. Bei einem komplizierteren Bruch stellt eine akkurate Reparatur eine Herausforderung dar und es kommt zu einzelnen Fehlern, wobei es zu lokalen Mutationen kommen kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Cas9-Spaltung nicht nur stumpfe Enden, sondern auch 1- oder 2-Nukleotid (nt) 5'-überhängende Enden erzeugen kann, da die RuvC-Nuklease-Domäne der Cas9 zusätzlich zur dritten auch die vierte oder fünfte Base stromaufwärts von einer PAM (*protospacer adjacent motif*) spalten kann [Shi et al., 2019; Zuo und Liu, 2016]. Findet man jedoch die DSB ohne fehlende Nukleotide, dann spricht man von „*scarless mutants*“.

Um zu untersuchen, mit welcher Genauigkeit die Cas9 am targetierten Locus die DSB eingeführt hat, wurden Sequenzabgleiche (*alignments*) der CRISPR-Klone der Transformationsansätze #1 (10 Klone), #2 (5 Klone) und #4 (2 Klone) mit der WT-Sequenz durchgeführt. Die *alignments* erfolgten an der 5'- und 3'- Position des DSB. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.5.1-1 bis 3.5.1-6 dargestellt und in Tabelle 3.5.3-1 Seite 97 zusammengefasst

In Transformationsansatz #1 (Donor: Plasmid, *codon usage* optimiert, keine homologen Sequenzen) wurden 10 CRISPR-Klone gefunden. Der Sequenzabgleich dieser mit der WT-Sequenz ergab, dass an der 5'-Position des DSB (siehe Abbildung 3.5.1) bei den Klonen #1 A1, A2 & A4 jeweils zwei Nukleotide fehlen, die Schnittstelle ist hier also nicht „*scarless*“. Gleiches gilt für die Klone #1 B2, C1, C2 & C3. Die Klone #1 A3 & A5 zeigten einen Verlust

von 13 Nukleotiden, einzig Klon #1 B1 zeigte an der 5'-Position des DSB keinen Verlust, die Schnittstelle ist hier also „scarless“. 3' des DSB zeigten sich die Klone #1 A1, A2 & A4 sowie #1 B2, C1, C2 & C3 als „scarless“, Klone #1 A3 & A5 zeigten einen Verlust von 15 Nukleotiden, Klon #1 B1 zeigte einen Verlust von 6 Nukleotiden. Als Fazit lässt sich festhalten, dass kein einziger Klon an der 5'- und 3'-Position "scarless" war.

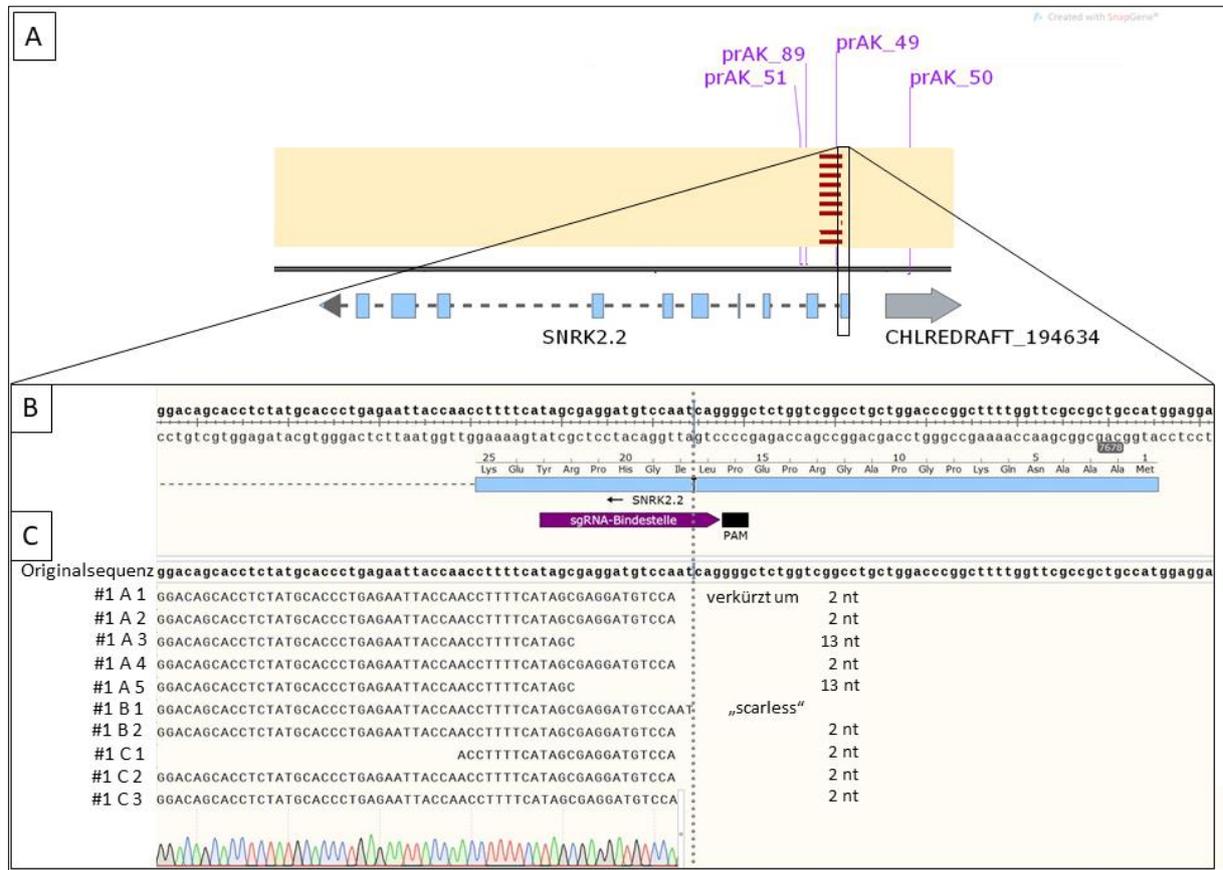


Abbildung 3.5.1-1: Darstellung des Sequenzabgleiches im SNRK2.2-Lokus mit dem WT. Gezeigt sind die Sequenzierergebnisse der CRISPR-Klone des Transformationsansatzes #1 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_10) 5' des DSB (Doppelstrangbruch). Von oben nach unten sind die Sequenzen der Klone #1 A1 - #1 C3 dargestellt. Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89 für alle außer #1 C1: prAK_49. (A): Im oberen Bereich der Abbildung ist eine Darstellung über den gesamten Locus gewählt, wobei der dunkelrote Bereich den Sequenzabschnitt markiert, welcher mit der WT-Sequenz identisch ist; Primer sind als lila-farbene Linien gekennzeichnet, der graue Balken repräsentiert eine dem SNRK2.2-Lokus benachbarte Sequenz CHLREDRAFT_194634. (B): im unteren Bereich der Abbildung ist ein repräsentativer Ausschnitt im Bereich der Cas-induzierten Schnittstelle gezeigt; hellblaue Balken repräsentieren exonische Bereiche, eine gestrichelte Linie zeigt intronische Bereiche, die sgRNA_Bindestelle ist durch einen pflaumenfarbenen Balken gezeigt, das PAM durch einen schwarzen Balken, Pfeilrichtungen geben die Leserichtung an. (C): zeigt die vergleichenden Sequenzen mit dem entsprechenden Ausschnitt des Elektropherogrammes, welches als Qualitätskontrolle dient (beispielhaft gezeigt für #1 als C3). Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 3, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „WT SNRK2.2 alignment Klon #.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene.

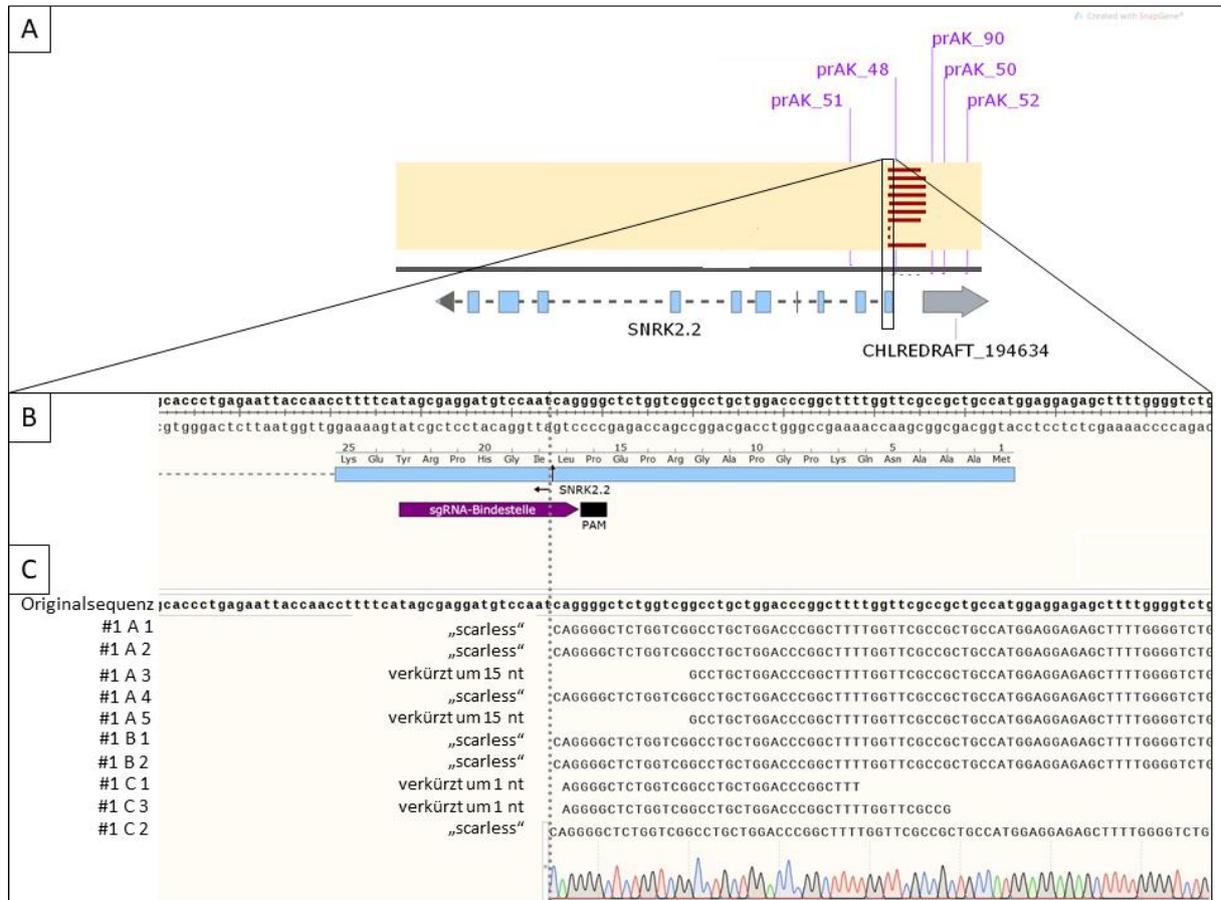


Abbildung 3.5.1-2: Darstellung des Sequenzabgleiches im *SNRK2.2*-Lokus mit dem WT. Gezeigt sind die Sequenzierergebnisse der CRISPR-Klone des Transformationsansatzes #1 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_10) 3' des DSB. Von oben nach unten sind die Sequenzen der Klone #1 A1 - #1 C3 dargestellt. Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_90 für alle außer #1 C1 & 2: prAK_48. (A): Im oberen Bereich der Abbildung ist eine Darstellung über den gesamten Locus gewählt, wobei der dunkelrote Bereich den Sequenzabschnitt markiert, welcher mit der WT-Sequenz identisch ist; Primer sind als lila-farbene Linien gekennzeichnet, der graue Balken repräsentiert eine dem *SNRK2.2*-Lokus benachbarte Sequenz CHLREDRAFT_194634. (B): im unteren Bereich der Abbildung ist ein repräsentativer Ausschnitt im Bereich der Cas-induzierten Schnittstelle gezeigt; hellblaue Balken repräsentieren exonische Bereiche, eine gestrichelte Linie zeigt intronische Bereiche, die sgRNA_Bindestelle ist durch einen pflaumenfarbenen Balken gezeigt, das PAM durch einen schwarzen Balken, Pfeilrichtungen geben die Leserichtung an. C: zeigt die zu vergleichenden Sequenzen mit dem entsprechenden Ausschnitt des Elektropherogrammes (beispielhaft gezeigt für #1 als C3), welches als Qualitätskontrolle dient. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 3, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „WT SNRK2.2 alignment Klon #.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene.

In Transformationsansatz #2 (Donor: Plasmid, nicht *codon usage* optimiert, keine homologen Sequenzen) wurden 5 CRISPR-Klone generiert. Der Sequenzabgleich dieser mit der WT-Sequenz ergab, dass an der 5'-Position (siehe Abbildung 3.5.3) des DSB bei den Klonen #2 A1, A2, B1 & B2 jeweils ein Nukleotid fehlt. Klon #2 C1 hingegen zeigt einen Verlust von 11

Nukleotiden. 3' des DSB (siehe Abbildung 3.5.4) zeigten sich alle Klone dieses Transformationsansatzes als verlustfrei, als „scarless“ an der DSB-Stelle.

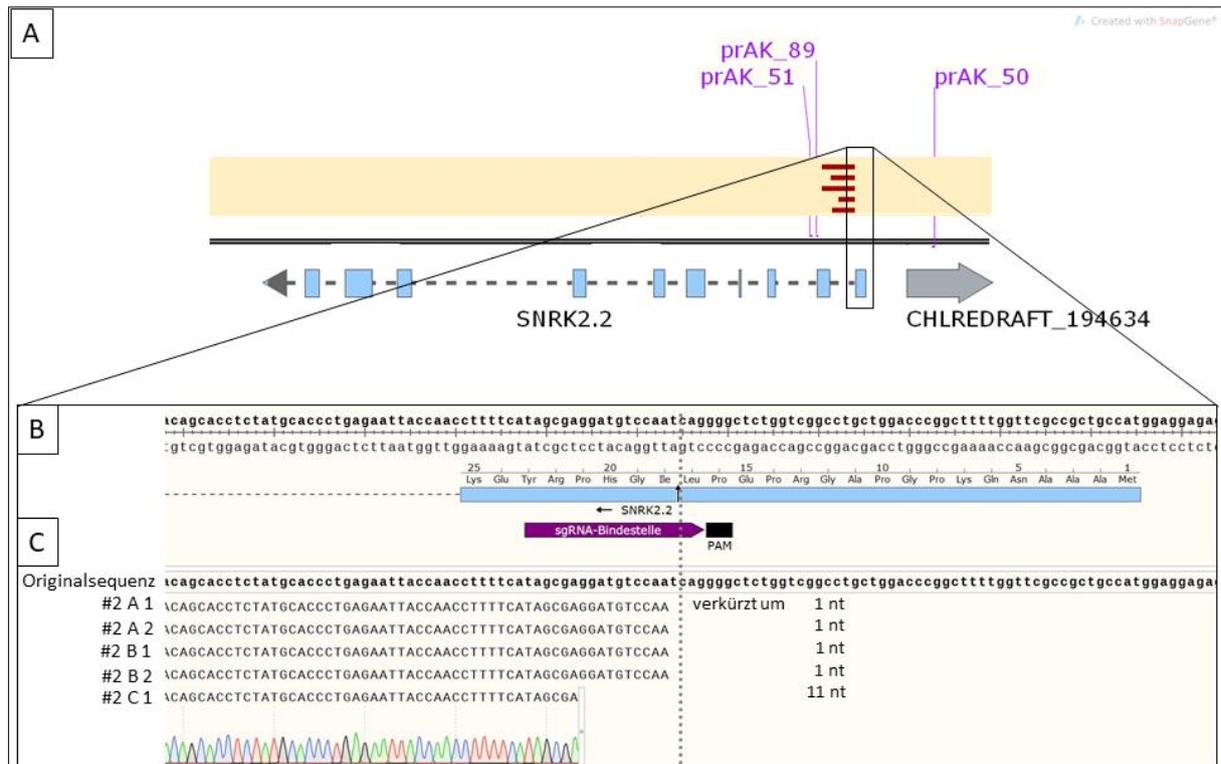


Abbildung 3.5.1-3: Darstellung des Sequenzabgleiches im *SNRK2.2*-Lokus mit dem WT. Gezeigt sind die Sequenzierergebnisse der CRISPR-Klone des Transformationsansatzes #2 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_11) 5' des DSB. Von oben nach unten sind die Sequenzen der Klone #2 A1 - #2 C1 dargestellt. Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89. (A): Im oberen Bereich der Abbildung ist eine Darstellung über den gesamten Locus gewählt, wobei der dunkelrote Bereich ein Sequenzabschnitt markiert, welcher mit der WT-Sequenz identisch ist; Primer sind als lila-farbene Linien gekennzeichnet, der graue Balken repräsentiert eine dem *SNRK2.2*-Lokus benachbarte Sequenz CHLREDRAFT_194634. (B): im unteren Bereich der Abbildung ist ein repräsentativer Ausschnitt im Bereich der Cas-induzierten Schnittstelle gezeigt; hellblaue Balken repräsentieren exonische Bereiche, eine gestrichelte Linie zeigt intronische Bereiche, die sgRNA_Bindestelle ist durch einen pflaumenfarbenen Balken gezeigt, das PAM durch einen schwarzen Balken, Pfeilrichtungen geben die Leserichtung an. C: zeigt die zu vergleichenden Sequenzen mit dem entsprechenden Ausschnitt des Elektropherogrammes (beispielhaft gezeigt für #2 C1), welches als Qualitätskontrolle dient, Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 3, als „.ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „WT *SNRK2.2* alignment Klon #.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene.

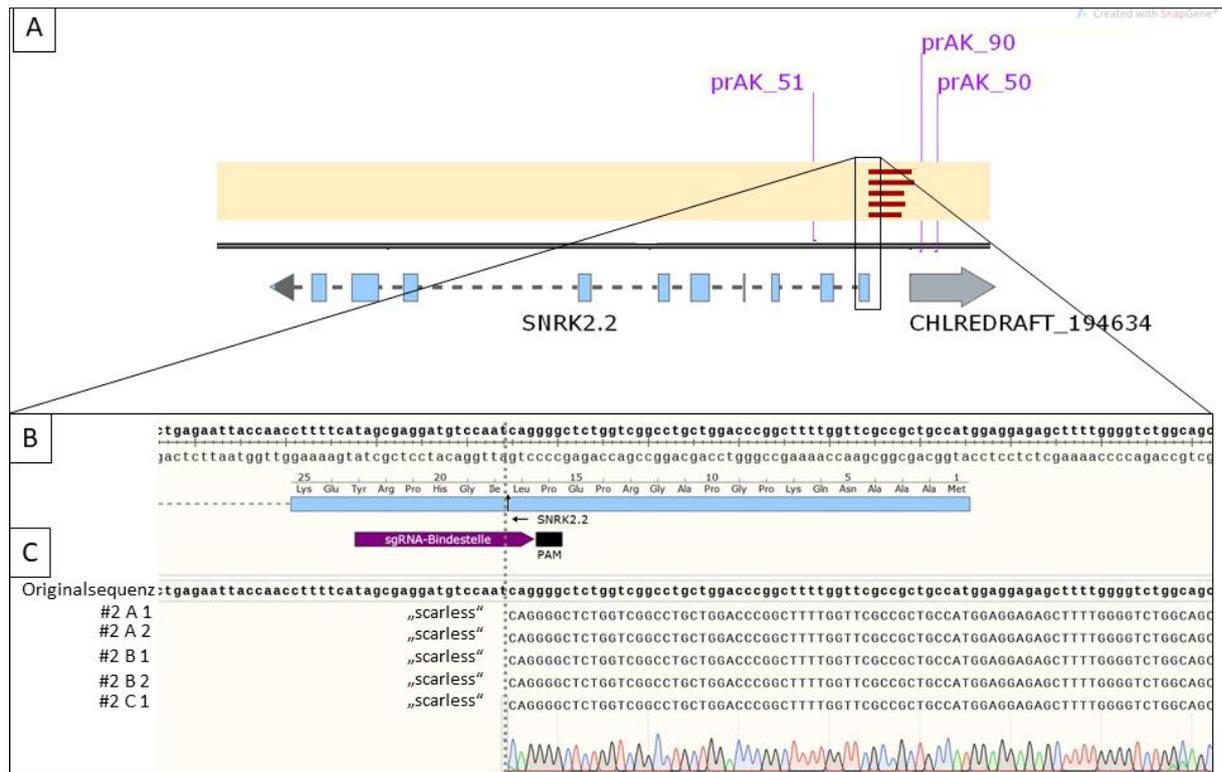


Abbildung 3.5.1-4: Darstellung des Sequenzabgleiches im SNRK2.2-Lokus mit dem WT. Gezeigt sind die Sequenzierergebnisse der Farbtest-positiven Klone des Transformationsansatzes #2 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_11) 3' des DSB. Von oben nach unten sind die Sequenzen der Klone #2 A1 - #2 C1 dargestellt. Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_90. (A): Im oberen Bereich der Abbildung ist eine Darstellung über den gesamten Locus gewählt, wobei der dunkelrote Bereich in Sequenzabschnitt markiert, welcher mit der WT-Sequenz identisch ist; Primer sind als lila-farbene Linien gekennzeichnet, der graue Balken repräsentiert eine dem SNRK2.2-Lokus benachbarte Sequenz CHLREDRAFT_194634. (B): im unteren Bereich der Abbildung ist ein repräsentativer Ausschnitt im Bereich der Cas-induzierten Schnittstelle gezeigt; hellblaue Balken repräsentieren exonische Bereiche, eine gestrichelte Linie zeigt intronische Bereiche, die sgRNA_Bindestelle ist durch einen pflaumenfarbenen Balken gezeigt, das PAM durch einen schwarzen Balken, Pfeilrichtungen geben die Leserichtung an. C: zeigt die zu vergleichenden Sequenzen mit dem entsprechenden Ausschnitt des Elektropherogrammes (beispielhaft gezeigt für #2 C1), welches als Qualitätskontrolle dient. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 3, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „WT SNRK2.2 alignment Klon #.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene.

In Transformationsansatz #4 (Donor: linearisierte DNA, nicht *codon usage* optimiert, keine homologen Sequenzen) wurden 2 CRISPR-Klone isoliert. Der Sequenzabgleich dieser Klone mit der WT-Sequenz ergab, dass es zum Verlust von einem bzw. zwei Nukleotiden sowohl an der 5'- als auch an der 3'- Position des DSB (siehe Abbildung 3.5.1-5 & 6) kam. Der DSB erfolgte hier nicht „scarless“.

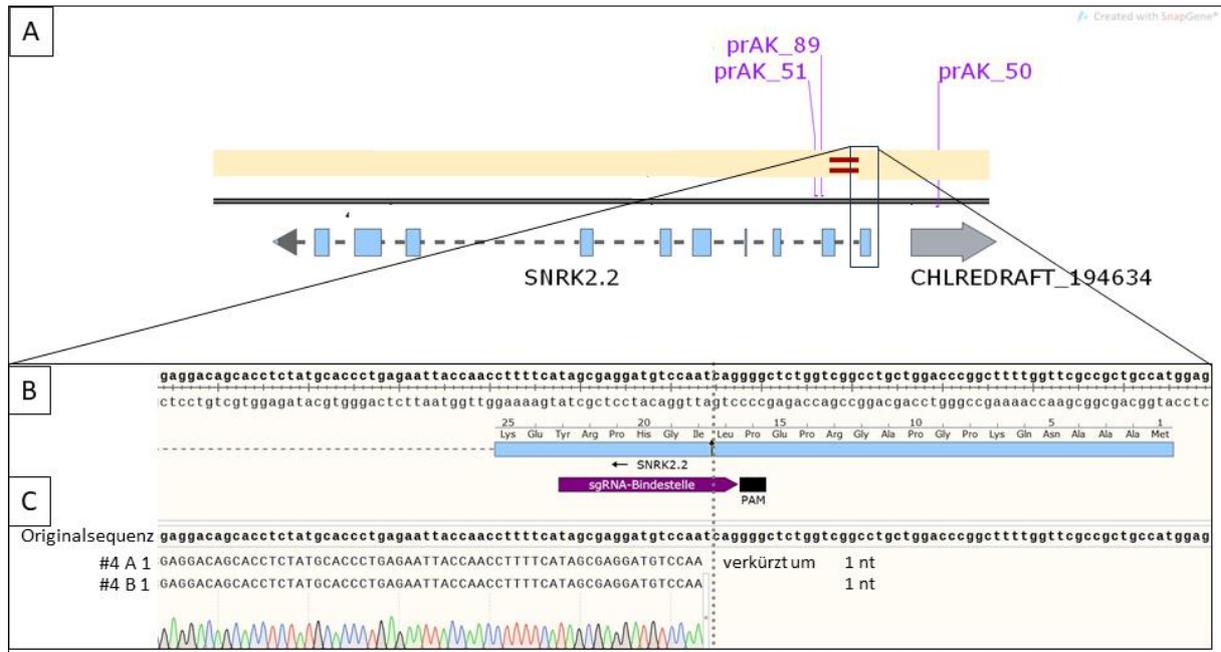


Abbildung 3.5.1-5: Darstellung des Sequenzabgleiches im *SNRK2.2*-Lokus mit dem WT. Gezeigt sind die Sequenzierergebnisse der Farbtest-positiven Klone des Transformationsansatzes #4 (DNA-Reparatur-Donor: M13-Amplikon dAK_11) 5' des DSB. Von oben nach unten sind die Sequenzen der Klone #4 A1 & #4 B1 dargestellt. Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89. (A): Im oberen Bereich der Abbildung ist eine Darstellung über den gesamten Locus gewählt, wobei der dunkelrote Bereich den Sequenzabschnitt markiert, welcher mit der WT-Sequenz identisch ist; Primer sind als lila-farbene Linien gekennzeichnet, der graue Balken repräsentiert eine dem *SNRK2.2*-Lokus benachbarte Sequenz *CHLREDRAFT_194634*. (B): im unteren Bereich der Abbildung ist ein repräsentativer Ausschnitt im Bereich der Cas-induzierten Schnittstelle gezeigt; hellblaue Balken repräsentieren exonische Bereiche, eine gestrichelte Linie zeigt intronische Bereiche, die *sgRNA_Bindestelle* ist durch einen pflaumenfarbenen Balken gezeigt, das PAM durch einen schwarzen Balken, Pfeilrichtungen geben die Leserichtung an. (C): zeigt die zu vergleichenden Sequenzen mit dem entsprechenden Ausschnitt des Elektropherogrammes (beispielhaft gezeigt für #4 B 1), welches als Qualitätskontrolle dient. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 3, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „WT *SNRK2.2* alignment Klon #.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene.

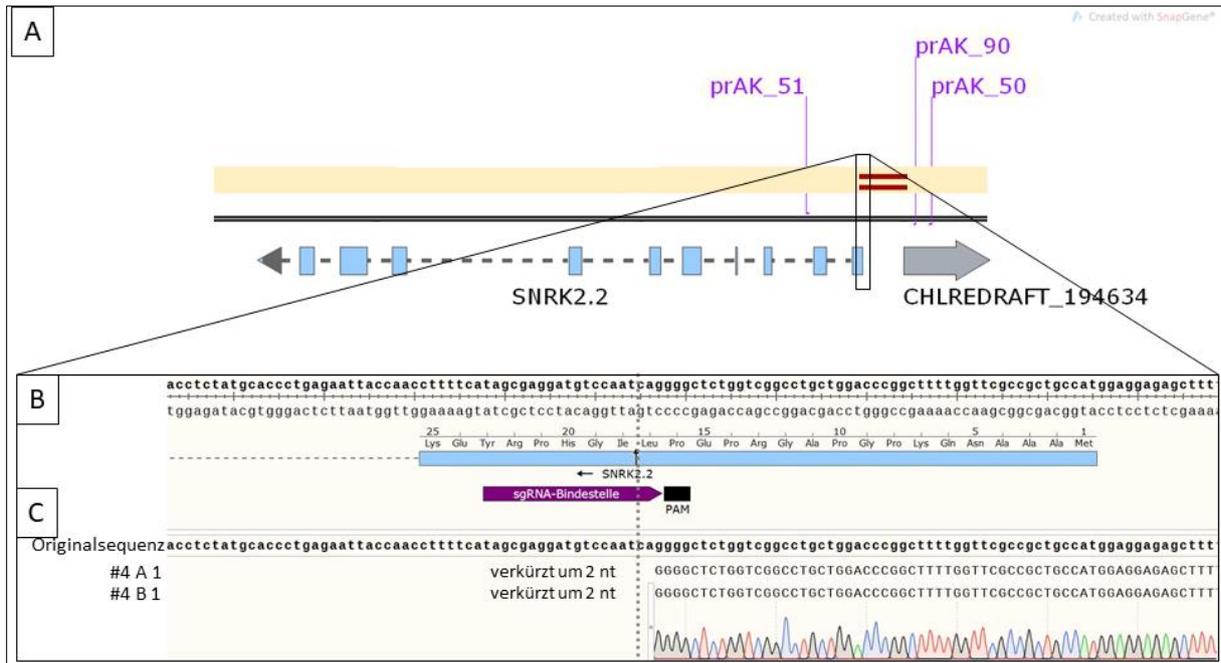


Abbildung 3.5.1-6: Darstellung des Sequenzabgleiches im *SNRK2.2*-Lokus mit dem WT. Gezeigt sind die Sequenzierergebnisse der Farbtest-positiven Klone des Transformationsansatzes #4 (DNA-Reparatur-Donor: M13-Amplikon dAK_11) 3' des DSB. Von oben nach unten sind die Sequenzen der Klone #4 A1 & #4 B1 dargestellt. Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51: Sequenzierprimer: prAK_90. (A): Im oberen Bereich der Abbildung ist eine Darstellung über den gesamten Locus gewählt, wobei der dunkelrote Bereich den Sequenzabschnitt markiert, welcher mit der WT-Sequenz identisch ist; Primer sind als lila-farbene Linien gekennzeichnet, der graue Balken repräsentiert eine dem *SNRK2.2*-Lokus benachbarte Sequenz CHLREDRAFT_194634. (B): im unteren Bereich der Abbildung ist ein repräsentativer Ausschnitt im Bereich der Cas-induzierten Schnittstelle gezeigt; hellblaue Balken repräsentieren exonische Bereiche, eine gestrichelte Linie zeigt intronische Bereiche, die sgRNA-Bindestelle ist durch einen pflaumenfarbenen Balken gezeigt, das PAM durch einen schwarzen Balken, Pfeilrichtungen geben die Leserichtung an. (C): zeigt die zu vergleichenden Sequenzen mit dem entsprechenden Ausschnitt des Elektropherogrammes (beispielhaft gezeigt für #4 B1), welches als Qualitätskontrolle dient. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 3, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „WT SNRK2.2 alignment Klon #.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene.

Bei der Betrachtung der Schnittstelle kann zusammenfassend gesagt werden, dass in keinem Transformationsansatz, unabhängig vom verwendeten Donor (plasmidär, linear, doppelsträngig, einzelsträngig, mit und ohne homologe Arme, (nicht) *codon usage* optimiert) eine Integration vollständig „scarless“ erfolgte. Häufig wurden um ein bis zwei Nukleotide verkürzte DSB-Stellen identifiziert, bei einigen Klonen war die Stelle sogar um 11 – 15 Nukleotide verkürzt.

Das Vorhandensein von möglichen Insertionen an der DSB-Stelle wird in Kapitel 3.5.2 behandelt.

Tabelle 3.5.3-1 S. 97 gibt einen Überblick über u.a. die in diesem Kapitel gefundenen Ergebnisse.

3.5.2 Untersuchung der inserierten Sequenzen

Neben der Betrachtung der Schnittstelle 5' und 3' des DSB wurde auch die Sequenz der tatsächlichen Insertion untersucht. Um zunächst die Länge der Insertionen abschätzen können, wurde eine PCR über den Bereich der Insertionsstelle der CRISPR-Klone #1, #2 und #4 (Übersicht aller in der vorliegenden Arbeit generierten CRISPR-Klone siehe Abbildung 3.2-2, Seite 62) durchgeführt. Die dazu verwendeten Primer prAK_50 & 51 (schematische Darstellung siehe Abbildung 3.5.2-1) wurden so designet, dass sie in der WT-Sequenz binden (prAK_50 bindet 572 bp *upstream* der gewünschten DSB, prAK_51 bindet 379 bp *downstream* der DSB). Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 3.5.2-2 Seite 82 gezeigt. Liegt der *SNRK2.2*-Lokus wildtypisch vor, erhält man ein Fragment von 951 Basenpaaren, bei einer gelungenen Insertion ein entsprechend größeres Fragment. Eine Übersicht über die gefundenen Fragmentgrößen und die zu erwartenden Insertionsgrößen gibt Tabelle 3.5.2-1 Seite 83.

Neben den Primern prAK_50 & 51 (Bindestellen im wildtypischen Bereich der gDNA) wurden für lokus-spezifische PCRs und sich daran anschließende Sequenzierungen (siehe Abbildungen 3.5.2-3ff) weitere Primer genutzt, um eine vollständige Sequenzierung über den gesamten Insertionsbereich zu bekommen: prAK_89, 49, 48 & 90 (siehe Tabelle 2.1.5-1 im Material- und Methodenteil). Schematisch sind die jeweiligen Primerbindestellen in Abbildung 3.5.2-1 Seite 80 gezeigt.

Abbildung 3.5.2-1 zeigt einen Ausschnitt aus dem *SNRK2.2*-Lokus, wobei der DNA-Doppelstrang als Doppel-Linie visualisiert ist, Exons mit einem hellblauen Pfeil gekennzeichnet und Introns mit einer Strichlinie dargestellt sind; Pfeile geben die Leserichtung an. Die Bindestelle der sgRNA (*single guiding RNA*) ist in einem violetten Balken veranschaulicht, gefolgt von einem schwarzen Balken, welcher das PAM (*protospacer adjacent motif*) repräsentiert. Die vorgesehene DSB-Stelle / Insertionsstelle ist in hellgrau mit einer Klammer gekennzeichnet. Die Primerbindestellen sind als lila-farbene Linien angezeigt, deren Orientierung an der Beschriftungslinie abzulesen ist. Neben dem Bereich des *SNRK2.2*-Lokus ist der benachbarte Bereich „CHLREDRAFT_194634“ annotiert. Dieser Bereich wurde als *codogen* für eine noch ungeklärte Funktion beschrieben. Der Vollständigkeit halber ist diese Annotation hier aufgeführt.

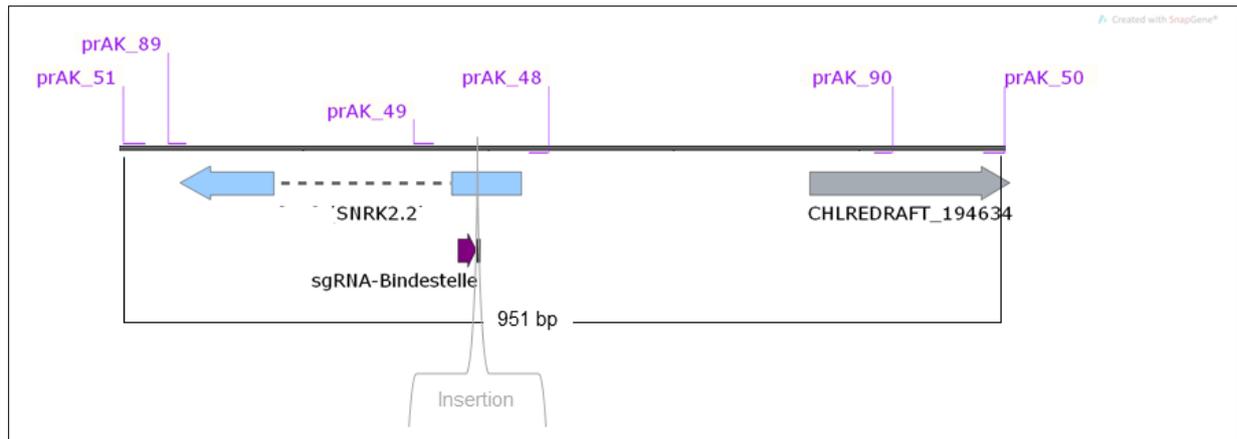


Abbildung 3.5.2-1: Schematische Darstellung der Bindung der verwendeten Primer (prAK_#, in lila dargestellt), welche zur Untersuchung von Insertionen im *SNRK2.2*-Lokus (Ausschnitt gezeigt) genutzt wurden. Die hier dargestellten Primer wurden für lokus-spezifische PCRs und die sich anschließenden Sequenzierungen (siehe Abbildung 3.5.2-3ff) genutzt. Nutzt man die Primer prAK_50 & 51, so erhält man für den WT ein Fragment von 951 bp, trägt die Stelle eine Insertion verlängert sich die Fragmentgröße entsprechend. Die Sequenzen der Primer sind im Material- und Methodenteil in Tabelle 2.1.5-1 aufgelistet. Hellblaue Balken repräsentieren exonische Bereiche, eine gestrichelte Linie zeigt intronische Bereiche, die sgRNA_Bindestelle ist durch einen pflaumenfarbenen Balken gezeigt, das PAM durch einen schwarzen Balken, Pfeilrichtungen geben die Leserichtung an, Primer sind als lila-farbene Linien gekennzeichnet, der graue Balken repräsentiert eine dem *SNRK2.2*-Lokus benachbarte Sequenz CHLREDRAFT_194634.

Abbildung 3.5.2-2 zeigt das Ergebnis der PCR-Ansätze, welche an der genomische DNA (siehe Kapitel 2.2.10 im Material- und Methodenteil) der in der vorliegenden Arbeit generierten CRISPR-Klone mit den Primern prAK_50 & 51 durchgeführt wurden (siehe Kapitel 2.2.9 im Material- und Methodenteil). Ziel war hierbei eine Größenabschätzung der Insertion. Folgende Proben wurden aufgetragen und mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.5 im Material- und Methodenteil) aufgetrennt: nt (*no template*) Kontrolle, WT (Wildtyp) sowie in (A) die Proben für den Transformationsansatz #1 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_10, Plasmid, *codon usage* optimiert), (B) Transformationsansatz #2 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_11, Plasmid, nicht *codon usage* optimiert) und (C) Transformationsansatz #4 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_13, linearisierte DNA). Für die WT-Probe ohne Insert wurde ein Fragment von 951 bp erwartet, eine davon abweichende Fragmentgröße zeigt eine Insertion an. In Tabelle 3.5.2-1 sind die erwarteten und gefundenen Fragmentgrößen aufgelistet.

In der wildtyp (WT)-Kontrolle (siehe Abbildung 3.5.2-2 A & B) wurde die erwartete Bande von 951 Basenpaaren gefunden. Zusammen mit dem Ergebnis der *no template* (nt) – Kontrolle zeigt dies, dass die PCR grundsätzlich funktioniert. Für die Klone #1 A1, A2 & A 4 (siehe Abbildung 3.5.2-2 A Spur 1-3) aus Transformationsansatz #1 (Donor: Plasmid, ohne homologe Arme, *codon usage* optimiert) wurde ein Fragment von 2200 – 2500 Basenpaaren (Schätzwert aus dem Agarosegel) gefunden. Zieht man davon die wildtypischen 951 Basenpaare ab, erhält man die zu erwartende Insertionslänge von 1250 – 1550 Basenpaaren. Diese Größenordnung konnte in der anschließenden Sequenzierung der Insertion bestätigt werden (siehe Abbildung

3.5.2-3). Für Klon #1 B1 wurde ein PCR-Fragment von 3500 – 4000 Basenpaaren gefunden werden, nach Abzug der wildtypischen 951 Basenpaaren erhält man eine Insertionslänge von 2550 – 3050 Basenpaaren. Auch dieses Ergebnis korrespondiert mit der in der sich anschließenden Sequenzierung (siehe Abbildung 3.5.2-4). Für die Klone #1 B2 und #1 C1 – 3 wurde ein PCR-Fragment von 3000 – 3200 Basenpaaren gefunden, für die Klone #1 A3 & A5 4500 - 5000 Basenpaare. Im Transformationsansatz #2 (Donor: Plasmid, ohne homologe Arme, nicht *codon usage* optimiert) wurden PCR-Fragmente der Größe 3000 – 4000 Basenpaare gefunden, im Transformationsansatz #4 (Donor: doppelsträngig, ohne homologe Arme, nicht *codon usage* optimiert) wurde jeweils ein PCR-Fragment von 3000 bp befunden. Bei allen Klonen konnte nach Abzug der wildtypischen 951 Basenpaare die den Sequenzierergebnissen korrespondierende Insert-Größe berechnet werden.

Für die sich an dieses Experiment anschließende Sequenzierung des Insertionsbereiches wurden die Banden in den Gelen, die in Abbildung 3.5.2-2 dargestellt wurden, ausgeschnitten. Die Probenaufarbeitung erfolgte wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben, die Sequenzierung erfolgte durch einen Dienstleister, die Auswertung erfolgte mit dem Programm SnapGene.

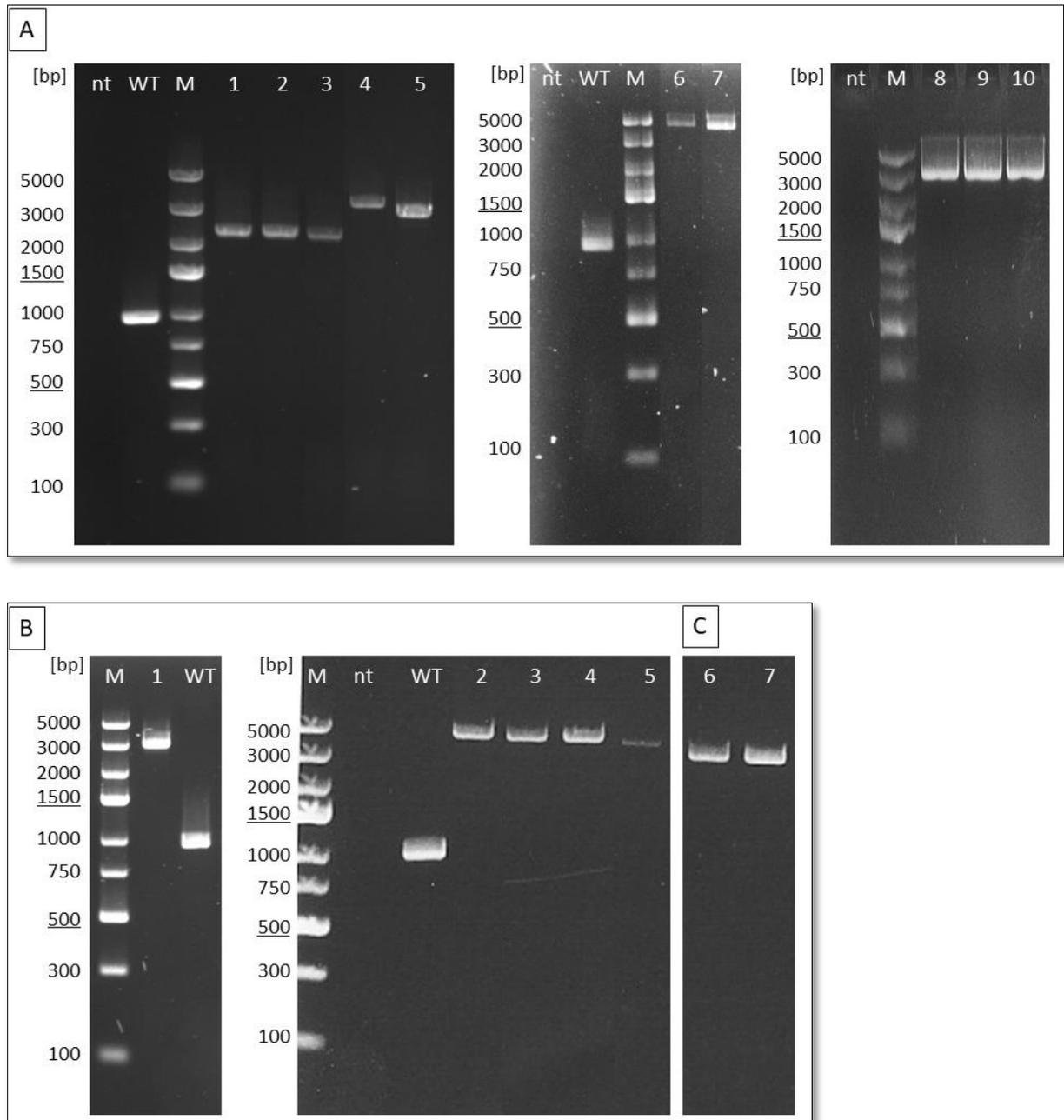


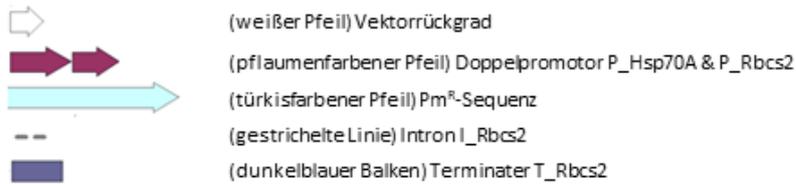
Abbildung 3.5.2-2: Agarosegelbild der PCR der CRISPR-Klone im *SNRK2.2*-Lokus. A) Klone des Transformationsansatzes #1 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_10, Plasmid, *codon usage* optimiert): (1) A1, (2) A2, (3) A4, (4) B1, (5) B2, (6) A3, (7) A5, (8) C1, (9) C2 & (1) C3; B) Klone des Transformationsansatzes #2 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_11, Plasmid, nicht *codon usage* optimiert): (1) A1, (2) A2, (3) B1, (4) B2 & (5) C1; C) Klone des Transformationsansatzes #4 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_13, linearisierte DNA): (6) A1 & (7) B1; nt: *no template* Kontrolle, WT: Wildtyp (Positivkontrolle, erwartet: 951 bp); verwendete Primer: prAK_50 & 51.

Tabelle 3.5.2-1: Übersicht der erwarteten und gefundenen Fragmentlängen der PCR mit den Primern prAK_50 & 51 im *SNRK2.2*-Lokus (Primerübersicht siehe Abbildung 3.5.2-1, Ergebnis der Agarosegelelektrophorese siehe Abbildung 3.5.2-2, Nummeriert sind die Transformationsansätze #1, #2 & #4 (Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit generierten CRISPR-Klone siehe Abbildung 3.2-2); A, B & C repräsentieren die verschiedenen Ansätze des Triplikats.

| Gelspur | Klon | Gefundene Fragmentlänge (Schätzwert aus der Agarosegelanalyse) | Zu erwartende Insertionslänge (Schätzwert, abzüglich des WT-Fragments) | Größenordnung bestätigt durch die anschließende Sequenzierung | Verweis |
|---------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|
| Abbildung 3.5.2-2 A | | | | | |
| 1 - 3 | #1 A1, A2 & A4 | 2200 – 2500 bp | 1250 – 1550 bp | Ja (1198 bp) | Abbildung 3.5.2-3 |
| 4 | #1 B1 | 3500 - 4000 bp | 2550 - 3050 bp | Ja (3057 bp) | Abbildung 3.5.2-5 |
| 5, 8 - 10 | #1 B2, #1 C1–C3 | 3000 – 3200 bp | 2050 - 2250 bp | Ja (2323 bp) | Abbildung 3.5.2-6 |
| 6 & 7 | #1 A3 & 5 | 4500 - 5000 bp | 3550 - 4050 bp | Ja (3601 bp) | Abbildung 3.5.2-4 |
| Abbildung 3.5.2-2 B | | | | | |
| 1 | #2 A1 | 3000 bp | 2050 bp | Ja (2025 bp) | Abbildung 3.5.2-7 |
| 2 - 4 | #2 A2, #2 B1–B2 | 4500 - 4800 bp | 3550 – 3850 bp | Ja (3851 bp) | Abbildung 3.5.2-8 |
| 5 | #2 C1 | 3500 - 4000 bp | 2550 – 3050 bp | Ja (2528 bp) | Abbildung 3.5.2-9 |
| Abbildung 3.5.2-2 C | | | | | |
| 6 & 7 | #4 A1 & B1 | 3000 bp | 2050 bp | Ja (1941 bp) | Abbildung 3.5.2-10 |

Die Ergebnisse der Sequenzierungen der CRISPR-Klone im *SNRK2.2*-Lokus sind in den folgenden Abbildungen dargestellt, die unter Verwendung der Primerpaare prAK_50 und 51 durchgeführt wurden (siehe Kapitel 2.2.11 im Material- und Methodenteil). Mit Hilfe der Sequenzierdaten wurden die jeweils inserierten Sequenzen *in silico* nachgebildet und als Basis für die in den Abbildungen 3.5.2-3 bis 3.5.2-10 dargestellten Sequenzabgleiche (*alignments*) genutzt. Einige Klone zeigten identische Insertionen, diese wurden entsprechend zusammen dargestellt.

Die nachfolgenden Abbildungen sind wie folgt aufgebaut, als Beispiel dient Abbildung 3.5.2-3: Abbildungsteil A zeigt schematisch, welches Ergebnis die Insertion gebracht hat. Dazu ist ein grauer Balken am oberen Rand der Abbildung dargestellt. Dieser symbolisiert die WT gDNA des *SNRK2.2*-Lokus. In Klammern kann man hier an der 5'- und 3'- Position des DSB eventuelle Deletionen sehen, z.B. „(-2 nt)“ bedeutet, dass die Stelle des DSBs um 2 Nukleotide verkürzt ist; „scarless“ bedeutet, dass es zu keiner Verkürzung kam. Aufgebrochen wird der graue Balken durch einen weißen Balken. Dieser repräsentiert die Insertion. Kam es an der 5'- bzw. 3'- Position des DSB zu Insertionen unbekannter Herkunft, so sind diese in grauer Schrift gezeigt, z.B. „8 bp N/A“ bedeutet, dass 8 Basenpaare inseriert wurden, deren Herkunft nicht bekannt ist bzw. nicht Teil des Donors ist. In blauer Schrift ist die Länge des Inserts, welches auf den Donor zurückzuführen ist, gekennzeichnet: 1051 Basenpaare. Die Länge der gesamten Insertion ist als Summe in schwarzer Schrift ebenfalls dort zu lesen: 1198 Basenpaare. Diese Zahl findet sich auch in der Tabelle 3.5.2-1 in der vorletzten Spalte wieder. Unter diesem Balken am linken Rand sind die Klone gelistet, deren Insertion identisch sind: #1 A1, A2 & A4. Der dunkelrote Balken zeigt an, dass eine Sequenzabdeckung über den gesamten Bereich vorliegt. Die in den Klonen isolierte Sequenz entspricht also dem am oberen Rand als Balken dargestellten Sequenz aus WT und Insertion. Um die Insertion genauer zu beschreiben, folgt eine Cartoon-Darstellung. Was oben im weißen Balken in grauer Schrift zu lesen war, ist nun ein grauer Balken: Insertion unbekannter Herkunft (8 und 139 bp N/A), wird in Abbildungsteil B aufgegriffen und später in Kapitel 4.1.2 diskutiert. In blauer Schrift war die Insertionslänge geschrieben, die auf den Donor zurückzuführen war. Dieser Teil soll hier näher betrachtet werden: weiße Pfeile: Teile des Vektorrückgrades des Donors (Teile des *f1 origin of replication*, *LacZ*-Gen), pflaumenfarbene Pfeile: Promotorregion *P_Hsp70A* (Hitzeschockprotein 70A) & *P_Rbcs2* (kleine Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-carboxylase), türkisfarbener Pfeil: codierender Bereich für die Paromomycinresistenz (*Pm^R*), produziertes Enzym: *AphVIII* (Aminoglycosid-3-phosphotransferase aus *Streptomyces rimosus*) gestrichelte Linie: Intron. Die Pfeilrichtung gibt die Leserichtung an. Zur Paramomycin-Resistenzkassette gehört noch ein Terminator, welcher im Beispiel der Abbildung 3.5.2-3 nicht Teil der Insertion ist und deshalb in der Abbildung auch nicht zu sehen ist. Durchaus gibt es aber Klone, bei denen der Terminator eingefügt wurde (z.B. Abbildung 3.5.2-4), dieser ist dort als dunkelblauer Balken dargestellt. Um zu zeigen, woher die inserierte Sequenz stammt, ist im unteren Teil der Abbildung zusätzlich der Donor schematisch gezeigt, wobei der inserierte Bereich des Donors blau markiert ist. Vektorkarten sind im Anhang, Kapitel 8.1, gezeigt, wobei die Darstellung der hier gezeigten Legende ebenfalls entspricht.



Im Teil B der Abbildung sind die Insertionen vergrößert dargestellt, deren Sequenz kein Teil des eingesetzten Donors war. Die zugehörigen Elektropherogramme sind dabei ebenfalls dargestellt, um die Qualität der Sequenzierung auch in diesem Bereich zu zeigen und um auszuschließen, dass es sich bei den Ergebnissen der Sequenzierung um Sequenzierartefakte handelte. Mögliche Ursachen für das Finden dieser Sequenzabschnitte werden in Kapitel 4.1.2 unter der Überschrift „Reparatur-Modus-Effizienz“ diskutiert.

Eine Übersicht aller Insertionen und Deletionen an der DSB-Stelle sind in Tabelle 3.5.3-1 Seite 97 zu finden.

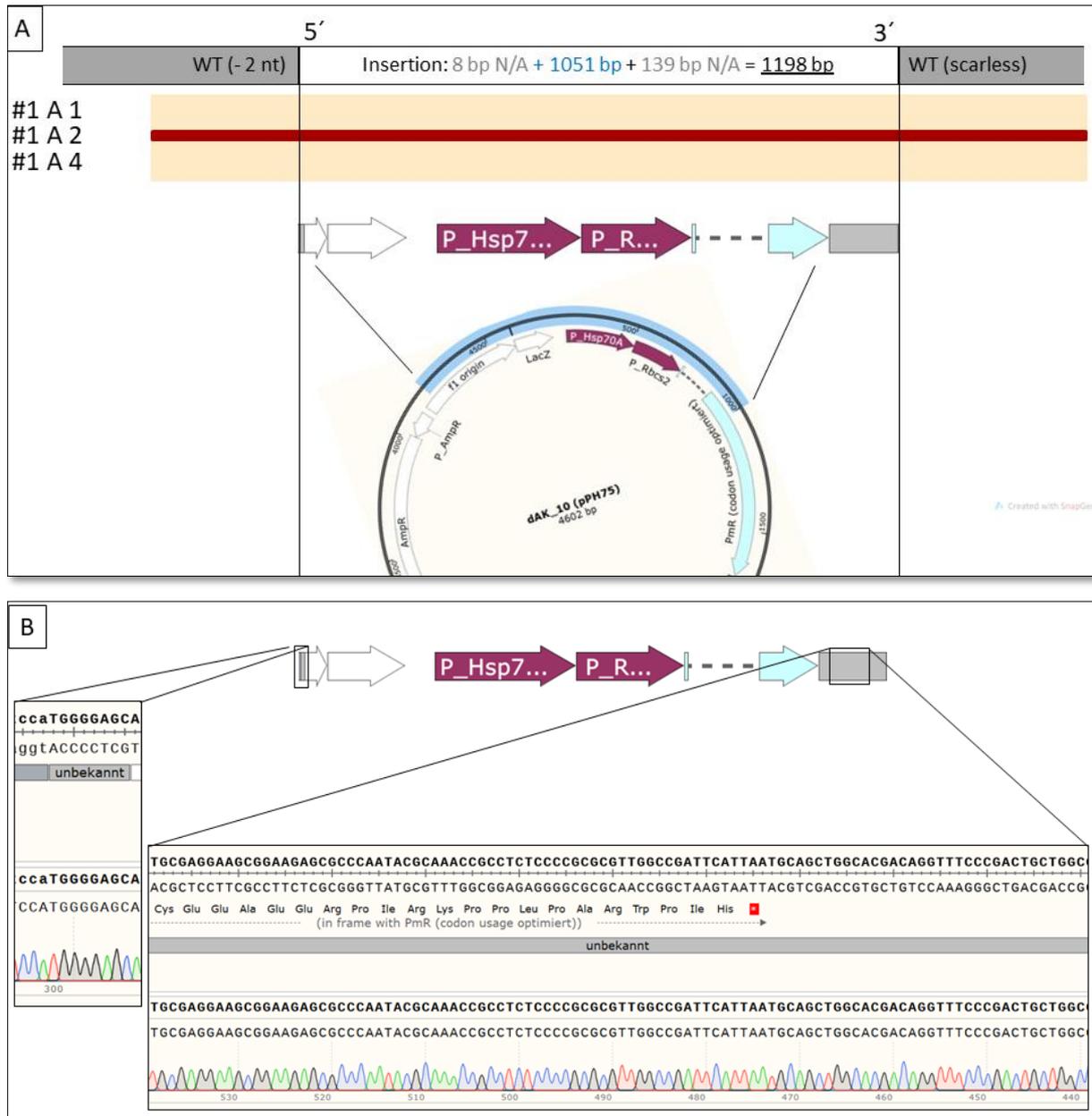


Abbildung 3.5.2-3: Darstellung der Insertionen der CRISPR-Klone #1 A1, A2 & A4 im *SNRK2.2*-Lokus (DNA-Reparatur-Donor: dAK_10, Plasmid, *codon usage* optimiert). A) Darstellung des Sequenzabgleiches und des inserierten Teils des Donors, Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89, prAK_90, M13uni-29 & T7prom. Der dunkelrote Bereich zeigt die Sequenzabdeckung; B) Darstellung zusätzlicher Insertionen außerhalb der Pm^R-Kassette: 5' des DSB wurde eine Insertion von 8 bp gefunden, 3' des DSB wurde eine Sequenz von 139 bp gefunden. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 4, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „Insert#.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene. Legende und Abbildungserklärung siehe Seite 84f.

In Transformationsansatz #1 (Donor: Plasmid, *codon usage* optimiert, keine homologen Bereiche) wurden 3 Klone identifiziert, welche eine identische Insertion am *SNRK2.2*-Lokus auswiesen: #1 A1, 2 & 4. Die Insertion am *SNRK2.2*-Lokus ist in Abbildung 3.5.2-3 A visualisiert. Insgesamt wurden 1198 Basenpaare inseriert, wovon 1051 Basenpaare auf den Donor zurückzuführen sind, an der 5'-Position des Doppelstrangbruchs (DSB) wurde 8 Basenpaare unbekannter Herkunft bei gleichzeitigem Fehlen von 2 Nukleotiden in der Wildtyp-

Sequenz („-2 nt“) gefunden und als Indel (Insertion/Deletion, siehe Einleitung Kapitel 1.1.2) identifiziert. 3´ kam es zu keinem Verlust an der Wildtyp-Sequenz („scarless“), allerdings konnte hier eine größere Insertion gefunden werden, auf die noch eingegangen wird.

Bei den Klonen #1 A1, 2 & 4 liegen zwei Besonderheiten vor, die so bei keinem weiteren CRISPR-Klon in der vorliegenden Arbeit gefunden werden konnten:

1. die Insertion einer unvollständigen Pm^R-Kassette, die die Vermittlung der Resistenz gegenüber Paromomycin in Frage stellt
sowie
2. eine Insertion 3´ der DSB, deren Sequenz z. T. auf einen Teil des Vektorrückgrades zurückzuführen ist; jedoch in *antisense*

Zur ersten Besonderheit: Die Sequenzierung im *SNRK2.2*-Lokus ergab, dass neben einem Teil des Vektorrückgrades des bei der Transformation eingesetzten Donors (Teil des *origin of replication* *f1* und dem LacZ-Gen) der Doppelpromotor und der intronische Bereich inserierten, jedoch die für das AphVIII codierende Sequenz, also das gegen Paromomycin Resistenz-vermittelnde Enzym, nur 15,7 % (129 Basenpaare von 822 Basenpaaren insgesamt, intronischer Bereich abgezogen). Die Kristallisierung der Phosphotransferase AphVIII machte eine Strukturanalyse möglich, bei welcher sich ein Serin-Rest als Schlüsselaminosäure für die Substratbindung in der N-terminalen *loop*-Struktur zeigte [Boyko et al., 2016]. Auch konnte der N-terminale Teil von Enzymen der Phosphotransferase-Familie als entscheidender Faktor bei der Enzymkatalyse bestimmt werden [Thompson et al., 2002]. Die in der Literatur beschriebenen Faktoren konnten bei der Sequenzierung der Insertion am *SNRK2.2*-Lokus der Klone #1 A 1, 2 & 4 gefunden werden und sind in Kapitel 4.1.2 weitergehend beschrieben, eine Rückführung der Resistenz-Vermittlung auf diese Insertion ist jedoch nicht möglich. Die Substratbindetasche der Phosphotransferase liegt im C-terminalen Teil [Boyko et al., 2016] (BRENDA-Eintrag: EC 2.7.1.B26, PDB: 4H05, Auflösung: 2,15 Å), ist diese nicht vorhanden, ist eine Funktionalität des Enzyms nicht möglich.

Nichtsdestotrotz wurden die Klone #1 A1, 2 & 4 als CRISPR-Klone identifiziert: sie wuchsen auf Selektionsmedium und zeigten im Farbttest (siehe Material- und Methodenteil Kapitel 2.2.8) die für eine am *SNRK2.2*-Lokus befindliche Mutation typische Blaufärbung. In Kapitel 4.1.2 unter der Teilüberschrift „unvollständige Insertion der Genkassette“ S. 118 wird dies weiterführend diskutiert. Die Klone wurden bei der Berechnung der Targeteffizienz mit einbezogen. Die Besonderheiten der Insertionen werden in Kapitel 3.5 unter dem Begriff der Reparatur-Modus-Effizienz berücksichtigt.

Zur zweiten Besonderheit: Bei den Klonen #1 A1, 2 & 4 kam es 3' der oben beschriebenen Insertion zu einer weiteren Insertion: ein Fragment von 139 Basenpaaren wurde hier zusätzlich identifiziert (Abbildung 3.5.2-3 B). Dieser Sequenzabschnitt konnte zunächst nicht dem Donor zugeordnet werden und wurde deshalb einem separaten *alignment* unterzogen. In Kapitel 4.1.2 wird dies weiterführend diskutiert.

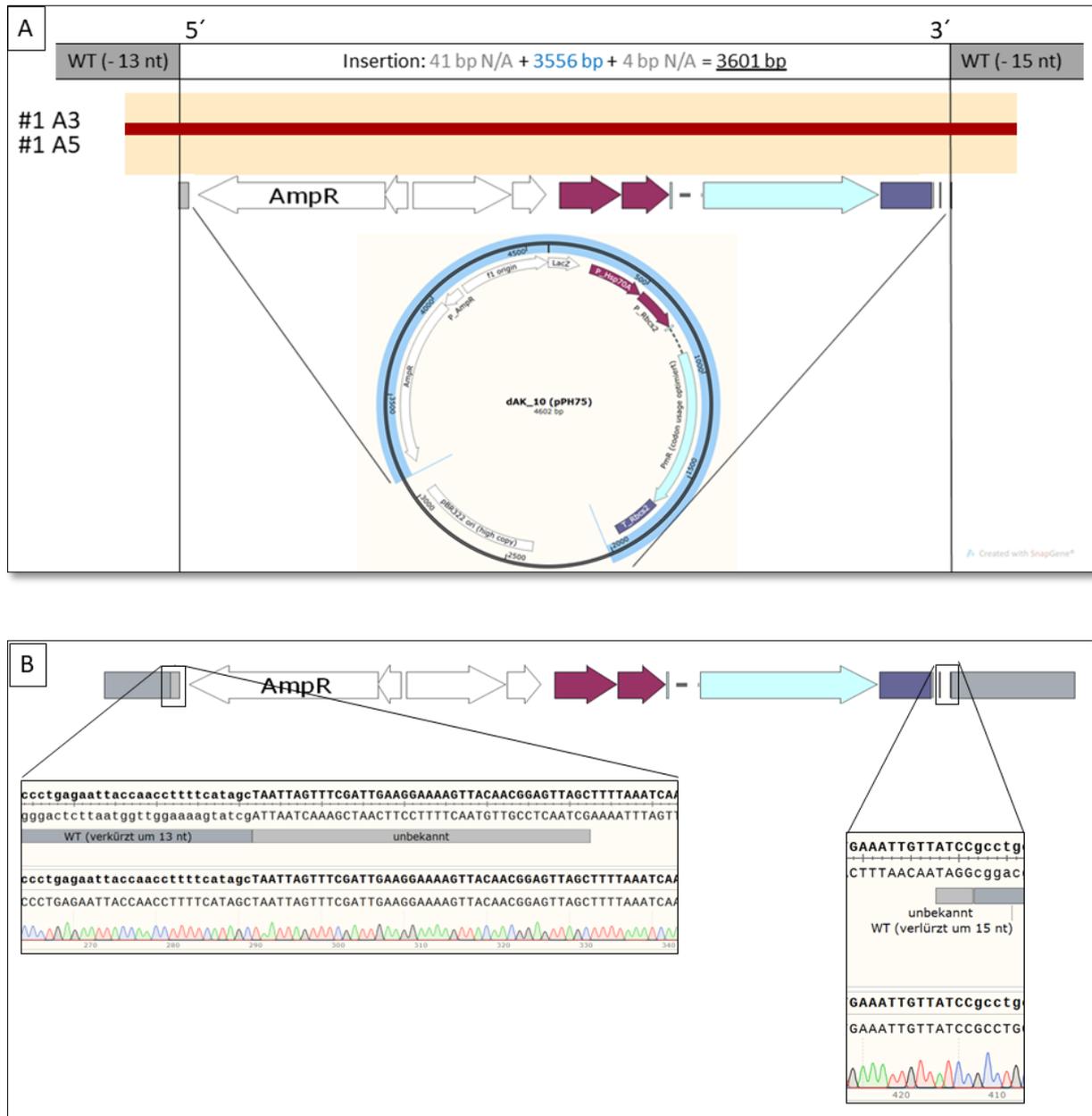


Abbildung 3.5.2-4: Darstellung der Insertionen der CRISPR-Klone #1 A3 & A5 im *SNRK2.2*-Lokus (DNA-Reparatur-Donor: dAK_10, Plasmid, *codon usage* optimiert). A) Darstellung des Sequenzabgleiches und des inserierten Teils des Donors, Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89, prAK_90, prAK_101, prAK_116, prAK_82, prAK_T7prom, prAK_83 & T3. Der dunkelrote Bereich zeigt die Sequenzabdeckung; B) Darstellung zusätzlicher Insertionen außerhalb der Pm^R-Kassette: 5' des DSB wurde eine Insertion von 41 bp gefunden, 3' des DSB wurde eine Sequenz von 4 bp gefunden. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 4, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „Insert#.dna“-Datei aufgeführt. Die Deletionen von 13 bzw. 15 Nukleotide an der 5'- bzw. 3'- Position des DSB sind Gegenstand

der Abbildungen 3.5.1-1 & 2. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene. Legende und Abbildungserklärung siehe Seite 84f.

Die Sequenziererergebnisse der CRISPR-Klone #1 A3 und A5 sind in Abbildung 3.5.2-4 A gezeigt. Es zeigte sich, dass beide Klone eine identische Insertion von 3601 bp tragen. Damit sind die Insertionen dreimal so lang wie in den Klonen #1 A1, A2 und A4 (Abbildung 3.5.2-3). Es konnte bis auf den Ori des Vektors fast das gesamte Plasmid (dAK_10, siehe Tabelle 2.1.6-1), welches als DNA-Reparatur-Donor eingesetzt wurde, an der Insertionsstelle gefunden werden. Außerdem wurden große Teile des Vektorrückgrates (Ampicillin-Resistenzkassette, f1-Origin, LacZ) sowie die vollständige Paromomycin-Resistenzkassette gefunden. Bei den Klonen #1 A1 & A5 wurden 13 bzw. 15 nt-Deletionen 5' bzw. 3' des DSB gefunden. Zusätzlich dazu wurde eine Insertion 5' des DSB von 41 bp detektiert, deren Sequenz nicht Teil des Donors war (Abbildung 3.5.2-4 B). Die Herkunft der Sequenz aus dem Genpool von *C. reinhardtii* und des Plasmids konnte durch BLAST Analysen ausgeschlossen werden. Deshalb wurde dies als Indel (Insertion/Deletion, Def. siehe Einleitung Kapitel 1.2.3) interpretiert. 3' des DSB wurden außerdem 4 bp (ATCC) identifiziert, welche so weder Teil der WT-Sequenz noch des DNA-Reparatur-Donors sind. Auch dies wurde als Indel interpretiert.

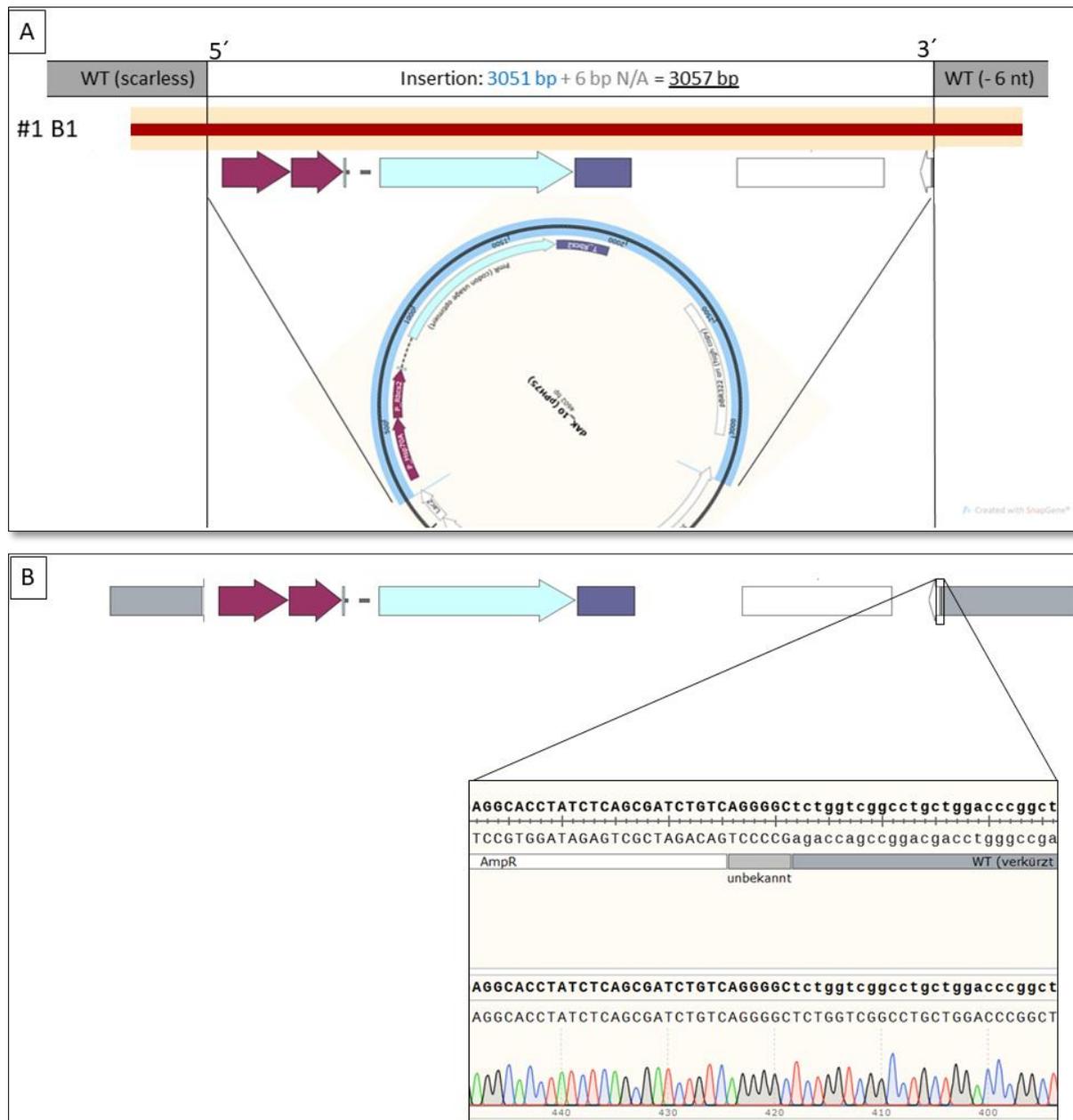


Abbildung 3.5.2-5: Darstellung der Insertion des CRISPR-Klons #1 B1 im *SNRK2.2*-Lokus (DNA-Reparatur-Donor: dAK_10, Plasmid, *codon usage* optimiert). A) Darstellung des Sequenzabgleiches und des inserierten Teils des DNA-Reparatur-Donors, Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89, prAK_90, M13rev-29, prAK_112, prAK_113. Der dunkelrote Bereich zeigt die Sequenzabdeckung; B) Darstellung einer zusätzlichen Insertion außerhalb der Pm^R-Kassette: 3' des DSB wurde eine Sequenz von 6 bp gefunden. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 4, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „Insert#.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene. Legende und Abbildungserklärung siehe Seite 84f.

Für den Klon #1 B1 wurde eine Insertion von 3057 Basenpaaren gefunden, welche in Abbildung 3.5.2-5 gezeigt ist. Diese Insertion beinhaltet die Sequenz der Paromomycin-Resistenzkassette vollständig, außerdem konnte die Insertion von Teilen des Vektors beobachtet werden (*origin of replication*, pBR322). Abbildung 3.5.2-5 B zeigt 3' des DSB ein Indel: sechs Nukleotide in der WT-Sequenz fehlen (*deletion*), wohingegen sechs Basenpaare unbekannter Herkunft eingefügt wurden (*insertion*). 5' des DSB wurde keine solche

Veränderung gefunden, hier lag eine „saubere“ („scarless“) Insertion. Die Paromomycin-Kassette lag vollständig und in der richtigen Orientierung (*sense*) vor.

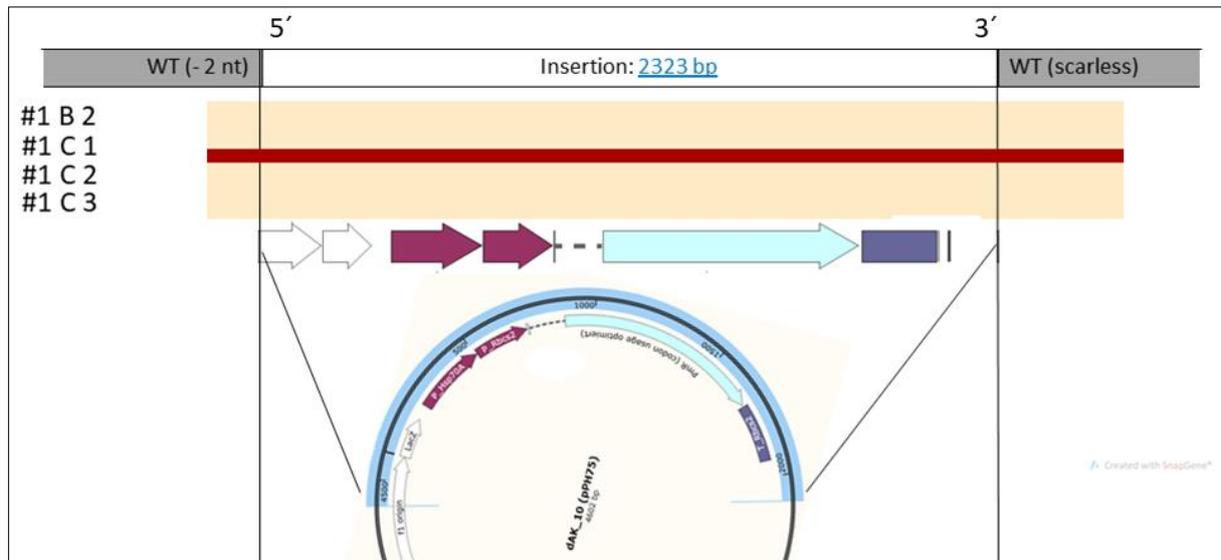


Abbildung 3.5.2-6: Darstellung der Insertionen der Klone #1 B2, #1 C1, C2 & C3 im *SNRK2.2*-Lokus (DNA-Reparatur-Donor: dAK_10, Plasmid, *codon usage* optimiert) als Darstellung des Sequenzabgleiches und des inserierten Teils des DNA-Reparatur-Donors, Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89, prAK_90, prAK_49, prAK_48, prAK_50, prAK_102, prAK_112, prAK_113, M13uni-21, 114 & prAK_115. Der dunkelrote Bereich zeigt die Sequenzabdeckung. Es wurden keine Indels gefunden. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 4, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „Insert#.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene. Legende und Abbildungserklärung siehe Seite 84f.

Die Klone #1 B2, #1 C1, C2 und C3 (Abbildung 3.5.2-6) wiesen eine Insertionsgröße von 2323 bp auf. Bei allen vier Klonen wurden Teile des Vektorrückgrades sowohl 5' als auch 3' der Paromomycin-Kassette gefunden. 5' des DBS wurde eine Verkürzung des WT um zwei Nukleotide gefunden. Sonst wurden keine Basen eingefügt oder deletiert. Die Paromomycin-Resistenzkassette lag vollständig und *sense* vor.

für die Translation initiiert. Schaut man sich jedoch an, dass neben der vom Donor stammenden Sequenz weitere 19 Nukleotide unbekannter Herkunft als Indel inseriert wurden, erkennt man einen *frameshift*, der diese Annahme in Frage stellt. Die weitere Diskussion erfolgt in Kapitel 4.1.2.

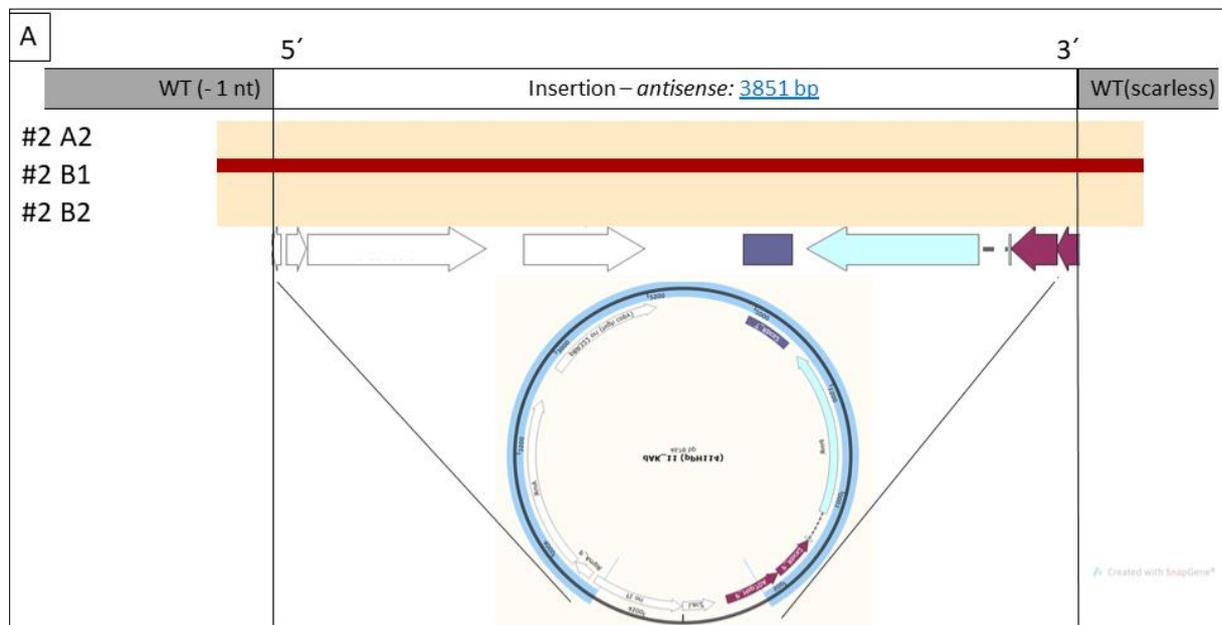


Abbildung 3.5.2-8: Darstellung der Insertionen der CRISPR-Klone #2 A2, #2 B1 & B2 im *SNRK2.2*-Lokus (DNA-Reparatur-Donor: dAK_11, Plasmid, nicht *codon usage* optimiert) als Darstellung des Sequenzabgleiches und des inserierten Teils des DNA-Reparatur-Donors, Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89, prAK_90, Pollock_9, prAK_112 & prAK_117, prAK_80 & prAK_81. Der dunkelrote Bereich zeigt die Sequenzabdeckung. Es wurden keine Indels gefunden. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 4, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „Insert#.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene. Legende und Abbildungserklärung siehe Seite 84f.

In den Klonen #2 A2, #2 B1 und B2 des Transformationsansatzes #2 mit plasmidären, nicht *codon usage* optimierter Pm^R-Sequenz, wurde die Insertion *antisense* gefunden (Abbildung 3.5.2-8). Auch hier ist der Bereich des Doppelpromotors interessant: der Promotor fehlt zwar nicht komplett, so wie bei Klon #2 A1 (Abbildung 3.5.2-7) ist aber dennoch nicht vollständig. Teile des P_Hsp70A fehlen. Der P_Rbcs2 ist vollständig. Dies ist ausreichend, um ein Wachstum auf dem Selektionsmedium zu ermöglichen [Stevens et al., 1996]. Historisch gesehen stellt der Rbcs2-Promotor einen der ersten Promotoren dar, welcher in *C. reinhardtii* genutzt wurde. Eine Kopplung an den Promotor des Hitzeschockproteins 70 A erfolgte 2001 und steigerte die Expressionsraten signifikant [Schroda et al., 2001]. Studien zur Promotor-abhängigen Produktausbeute waren nicht Teil der vorgelegten Arbeit. Das Auftreten von Indels wurde bei diesen Klonen nicht beobachtet werden, mit einer Ausnahme: das Fehlen eines Nukleotids des WT 5' des DSB.

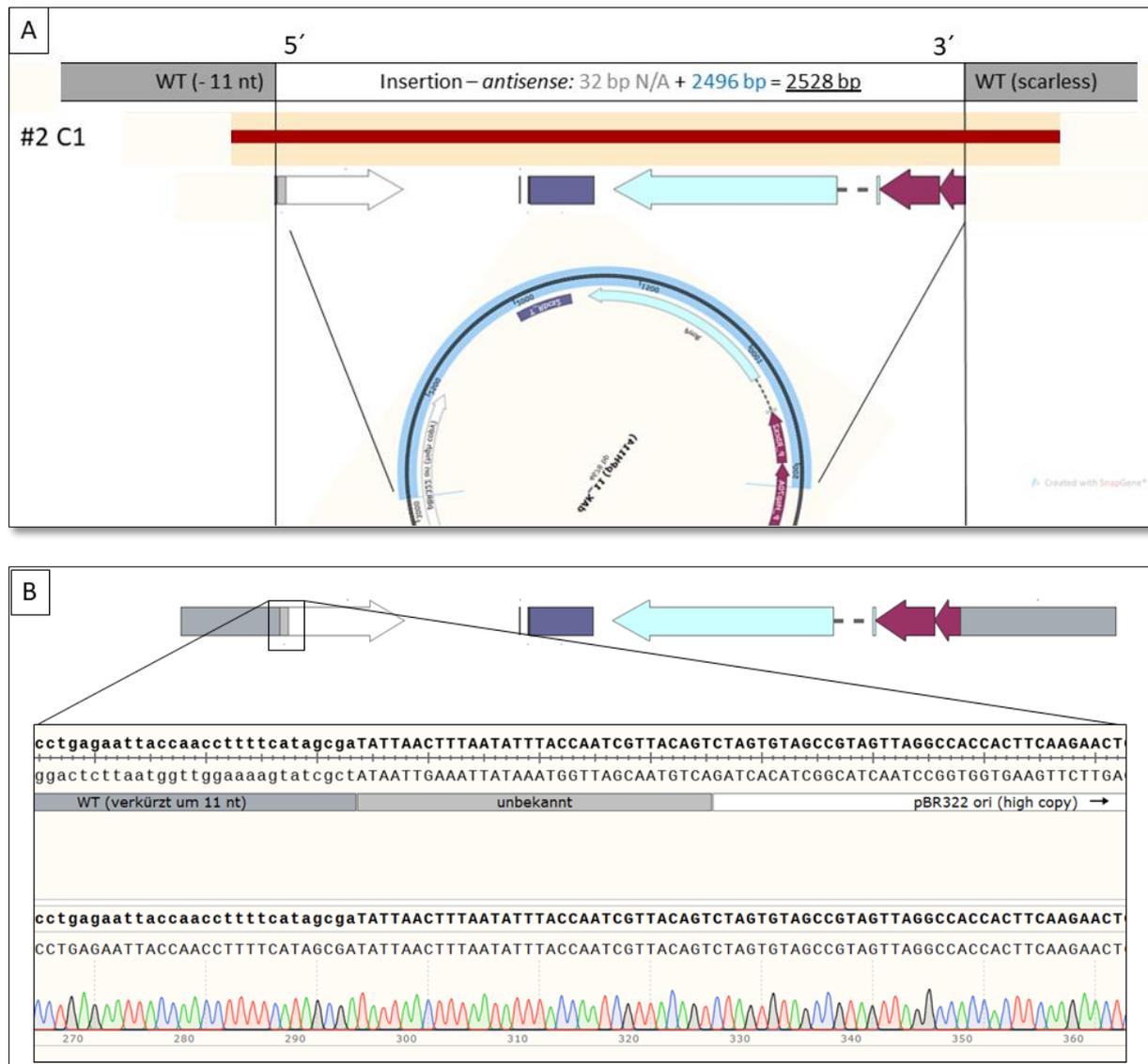


Abbildung 3.5.2-9: Darstellung der Insertionen des CRISPR-Klons #2 C1 im *SNRK2.2*-Lokus (DNA-Reparatur-Donor: dAK_11, Plasmid, nicht *codon usage* optimiert). A) Darstellung des Sequenzabgleiches und des inserierten Teils des DNA-Reparatur-Donors, Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89, prAK_90, prAK_113, M13rev-29, Pollock_6 & prAK_112. Der dunkelrote Bereich zeigt die Sequenzabdeckung; B) Darstellung zusätzlicher Insertionen außerhalb der *Pm^R*-Kassette: 5' des DSB wurde eine Insertion von 32 bp gefunden. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 4, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „Insert#.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene. Legende und Abbildungserklärung siehe Seite 84f.

Die Insertion des CRISPR-Klons #2 C1 beträgt 2528 bp und erfolgte *antisense* (Abbildung 3.5.2-9, der Doppelpromotor ist auch hier, wie bei den Klonen #2 A2, #2 B1 & B2 (Abbildung 3.5.2-8) nur teilweise inseriert worden, wobei der *P_Rbcs2* vollständig vorliegt. Interessanter Weise wurde in beiden Fällen die Promotorregion *P_Hsp70A* exakt an derselben Stelle verkürzt und inseriert. Da der Promoter der kleinen Untereinheit der RuBisCO (*P_Rbcs2*) vollständig vorliegt, ist die Produktion des Resistenz-vermittelnden Enzyms AphVIII (Aminoglycosid-3-phosphotransferase, siehe Kapitel 1.1.6) gegeben [Stevens et al., 1996]. Die Verknüpfung mit der Promotorregion des Hitzeschockproteins *Hsp70A* verstärkt die Leistung

des Expressionssystems [Schroda 2001], ist für eine grundsätzlich funktionale Genkassette aber nicht zwingend notwendig. Im Vergleich zu den Klonen #2 A2, #2 B1 & B2 wurde auch hier ein Teil des Vektorrückgrades zusätzlich zur Pm^R-Kassette inseriert, jedoch ist dieser deutlich kürzer. Während bei den Klonen #2 A2, #2 B1 & B2 der *origin of replication* pBR322, die Kassette zur Vermittlung der Resistenz gegen Ampicillin sowie ein kleiner Teil des *origin of replication* f1 inserierten, ist beim Klon #2 C1 lediglich ein Teil des *origin of replication* pBR322 eingefügt worden (438 von 589 Basenpaaren, 74 %). Daher ist die Gesamtlänge des Inserts auch deutlich kürzer: 2528 im Vergleich zu 3851 Basenpaaren. An der 5'-Position des DSB sind außerdem 32 Basenpaare unbekannter Herkunft gefunden worden. Die WT-Sequenz ist an dieser Stelle um 11 Nukleotide verkürzt. Es handelt sich dabei um ein Indel. 3' des DSBs wurden keine zusätzlichen Fragmente gefunden, die Insertion erfolgte „scarless“.

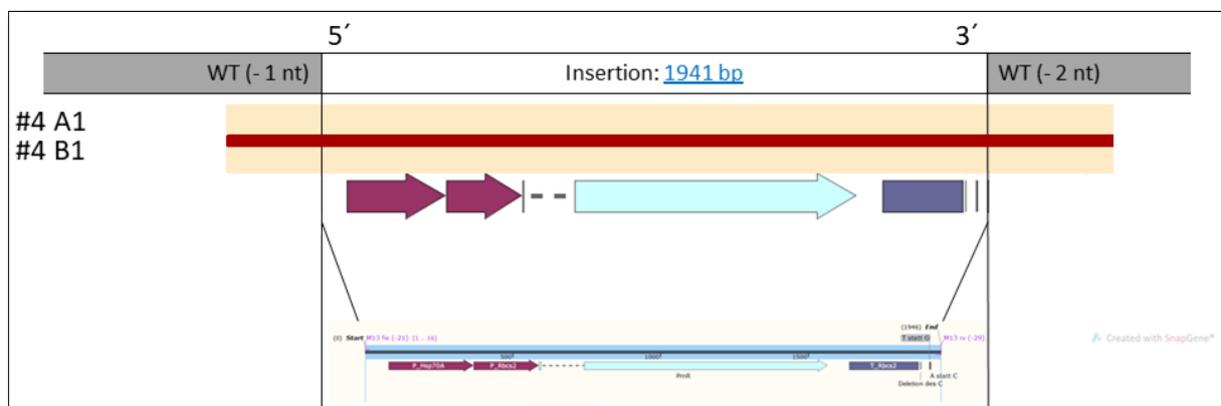


Abbildung 3.5.2-10: Darstellung der Insertionen der Klone #4 A1 & #4 B1 im *SNRK2.2*-Lokus (DNA-Reparatur-Donor: dAK_13, linearisierte DNA) als Darstellung des Sequenzabgleiches und des inserierten Teils des DNA-Reparatur-Donors, Template für die Sequenzierung: PCR-Amplikon der Primer prAK_50 & 51; Sequenzierprimer: prAK_89, prAK_90, M13uni-21, T3 & M13rev-29. Der dunkelrote Bereich zeigt die Sequenzabdeckung. Es wurden keine Indels gefunden. Die Daten der Sequenzierung sind dem digitalen Anhang, Ordner 4, als „ab1“-Datei zu entnehmen. Der hier dargestellte Sequenzabgleich (*alignment*) ist ebendort als „Insert#.dna“-Datei aufgeführt. Sequenzabgleich erstellt mit SnapGene. Legende und Abbildungserklärung siehe Seite 84f.

Die Insertion der CRISPR-Klone #4 A1 & B1 (1941 bp) ist in Abbildung 3.5.2-10 dargestellt. Im Transformationsansatz #4 wurde, im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Ansätzen, linearisierte DNA als Reparatur-Donor eingesetzt. Die Paromomycin-Kassette liegt vollständig und *sense* vor. Da lediglich die Resistenzkassette vom Donor codiert vorliegt, konnten, im Gegensatz zu den vorherigen Ansätzen, keine Teile des Vektorrückgrades Teil der Insertion werden. Es konnten an der 5'- und 3'-Position der DSB-Stelle Verkürzungen von ein bzw. zwei Nukleotiden festgestellt werden.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung verschiedener Donor-Varianten auf das Insertionsverhalten in der Mikroalge *C. reinhardtii*. Dazu wurden Donore eingesetzt, die plasmidär, linearisiert, doppelsträngig oder einzelsträngig waren, sie verfügten über homologe

Bereiche oder waren ohne diese ausgestattet. Es kamen Sequenzen mit und ohne *codon usage* Optimierung zum Einsatz (siehe Tabelle 3-1 Seite 56). In der Literatur wurden vor allem Plasmiden als Donor in *C. reinhardtii* verwendet, Arbeiten in der Zellkultur mit Maus-Embryonen und humanen Zellkulturen weisen jedoch daraufhin, dass auch die Arbeit mit anders designten Donoren zu einer erfolgreichen Insertion führen kann (siehe Einleitung Tabelle 1.1.4.4-1, Seite 16). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit mit der oben beschriebenen Vielzahl an Donoren gearbeitet. Die CRISPR-Klone #4 A1 & B1, welche mit einem linearisierten, doppelsträngigen Donor ohne homologe Bereiche und mit einer nicht *codon usage* optimierten Sequenz behandelt wurden, zeigten die gewünschte Insertion: Präzise (am targetierten Locus, keine zusätzlichen Insertionen unbekannter Herkunft) und vollständig (die gesamte Pm^R-Kassette integrierte). Dieses Ergebnis konnte mit den plasmidären Ansätzen nicht erreicht werden. Dabei zeigten sich die, in der Literatur beschriebenen Plasmide als unerwartet problematische Donore (z.B. Insertion von Teilen des Vektorrückgrades, unvollständige Insertion der Resistenz-vermittelnden Kassette). Der Einsatz einzelsträngiger Donore führte entgegen der Erwartungen zu keinem Ergebnis in *C. reinhardtii*. Die Verwendung doppelsträngiger und linearisierter Donore führten in den Experimenten der vorliegenden Arbeit hingegen zu einer erfolgreichen Insertion.

3.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Reparatur-Modus-Effizienzen

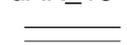
In Tabelle 3.5.3-1 Seite 97 sind die in Kapitel 3.5 herausgearbeiteten Ergebnisse der Versuche als Übersicht zusammengestellt. Dabei sind die DNA-Reparatur-Donoren, die Ereignisse an der 5´- und 3´- Position der Doppelstrangbruch (DSB)-Stelle als auch die Insertionslängen und deren Orientierung aufgeführt. In der Spalte der Insertion ist in Anlehnung an die Abbildungen 3.5.2-3 bis -10 die Insertion, welche auf den Donor zurückzuführen ist in blau dargestellt, zusätzlich eingefügte Fragmente, deren Herkunft nicht vom Donor stammt, sind in grau und mit „N/A“ visualisiert, die sich daraus ergebende Gesamtlänge des Inserts wurde in schwarzer Schrift dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Insertionen gefunden, die über den Reparaturmechanismus der homologen Rekombination (HR, Kapitel 1.1.3) eingefügt wurden. Die Transformationsansätze (Übersicht über alle Transformationsansätze siehe Tabelle 3-1 Seite 56), bei denen Donore mit homologen Bereichen eingesetzt wurden, führten zu keinen CRISPR-Klonen. Lediglich der Einsatz von DNA-Reparatur-Donoren ohne homologe Bereiche führten in der vorliegenden Arbeit zu Farbttest-positiven Klonen (siehe Material- und

Methodenteil, Kapitel 2.2.8), also zu Klonen, deren *SNRK2.2*-Lokus mutiert wurde (siehe Abbildung 3.2-3 Seite 62). Es liegt nahe, dass die Reparatur über die *end joining* Reparaturmechanismen (siehe Einleitung Kapitel 1.1.3) verlief, welche an späterer Stelle (Kapitel 4.1.2, Unterkapitel „Reparatur-Modus-Effizienz“) weitergehend diskutiert werden.

Tabelle 3.5.3-1: Übersicht über die Ergebnisse der Reparatur im *SNRK2.2*-Lokus aller Transformationsansätze, Farbcodierung: schwarz: Gesamtlänge der Insertion, blau: Insertion, deren Sequenz auf den Donor zurückzuführen ist, grau N/A: deren Herkunft nicht dem DNA-Reparatur-Donor entstammt und damit unbekannter Herkunft ist, grün bzw. orange: Orientierung der Insertion; fett: die Pm^R-Kassette wurde vollständig inseriert (einschließlich des Doppelpromotors, der codierenden Sequenz für das Enzym AphVIII, des Introns sowie des Terminators; schematische Darstellung der Pm^R-Kassette siehe Abbildung 3-1) entspricht die Länge der Insertion der Gesamtlänge der Insertion, so ist diese in blauer Schrift gezeit.

| Klon | Pikto- gramm des Donors | 5' DSB | 3' DSB | Insertion |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| #1 A1 #1 A2 #1 A4 | dAK_10  | -2 nt | <i>scarless</i> | 1198 bp (8 bp N/A + 1051 bp + 139 bp* N/A); Pm ^R -Kassette nicht vollständig (Pm ^R -Sequenz nicht vollständig, Terminator fehlt); Orientierung: <i>sense</i> *) davon 81 bp <i>antisense</i> identisch mit dem Vektorrückgrad des pPH75 |
| #1 A3 #1 A5 | | -13 nt | -15 nt | 3601 bp (41 bp N/A + 3556 bp + 4 bp N/A); Teile des Vektorrückgrates (f1-Ori, LacZ), Pm^R-Kassette vollständig Orientierung: <i>sense</i> |
| #1 B1 | | <i>scarless</i> | -6 nt | 3057 bp (3051 bp + 6 bp N/A); Pm^R-Kassette vollständig , Teile des Vektorrückgrates (Ori pBR322) Orientierung: <i>sense</i> |
| #1 B2 #1 C1 #1 C2 #1 C3 | | -2 nt | <i>scarless</i> | 2323 bp, keine zusätzlichen Sequenzen unbekannter Herkunft; Teil des Vektorrückgrates (f1-Ori, LacZ), Pm^R-Kassette vollständig Orientierung: <i>sense</i> |
| #2 A1 | dAK_11  | -1 nt | <i>scarless</i> | 2025 bp (2006 bp + 19 bp N/A); Teile des Vektorrückgrates (Ori pBR322), Pm ^R -Kassette nicht vollständig, Doppelpromotor fehlt Orientierung: <i>antisense</i> |
| #2 A2 #2 B1 #2 B2 | | -1 nt | <i>scarless</i> | 3851 bp, keine zusätzlichen Sequenzen unbekannter Herkunft; Teile des Vektorrückgrates (Teile des f1-Ori, Amp ^R , Ori pBR322, Pm ^R -Kassette nicht vollständig, Teile des P_Hsp70A fehlen) |

| | | | | |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | | Orientierung: <i>antisense</i> |
| #2 C1 | | -11 nt | <i>scarless</i> | 2528 bp (32 bp N/A + 2496 bp); Teile des Vektorrückgrates (Teile des Ori pBR322, Pm ^R -Kassette nicht vollständig, Teile des P_Hsp70A fehlen, siehe #2 A 2) Orientierung: <i>antisense</i> |
| #4 A1 #4 B1 | dAK_13  | -1 nt | -2 nt | 1941 bp, keine zusätzlichen Sequenzen unbekannter Herkunft; Pm^R-Kassette vollständig Orientierung: <i>sense</i> |

Wurde ein Plasmid als Donor angeboten (Transformationsansatz #1 & 2), wurde zum Teil neben der eigentlichen Zielsequenz (Pm^R-Kassette, bestehend aus dem Doppelpromotor, der für das gegen Paromomycin Resistenz-vermittelnde Enzym AphVIII, einem Intron und dem Terminator; schematische Darstellung der Pm^R-Kassette siehe Abbildung 3-1 des Ergebnisteils) auch Teile des Vektorrückgrates eingebaut, in manchen Fällen war die Insertion der Zielsequenz nicht vollständig und/oder *antisense*. Abgesehen von der deutlich geringeren Anzahl an erhaltenen Klonen im Transformationsansatz #4, in welchem mit linearisierter, doppelsträngiger DNA als Donor gearbeitet wurde, konnte dort die Zielsequenz vollständig und in *sense*-Orientierung eingebaut werden. Eine Insertion von Fragmenten, deren Herkunft nicht auf dem Donor basierte wurde für diese Klone nicht beobachtet, die Insertion von Fragmenten des Vektorrückgrates war hier nicht möglich, da der Donor lediglich die codierende Sequenz umfasste.

Bei allen generierten Klonen kam es an der DSB zum Verlust einiger Nukleotide der WT-Sequenz. Eine Deletion von meist ein bis zwei Nukleotiden, im Falle von #1 A3 & 5 sowie #2 C1 von 11 bis 15 Nukleotiden, wurde beobachtet. Das Auftreten von kurzkettigen Insertionen bei gleichzeitiger Deletion einiger Nukleotide an der DSB-Stelle (Indels) wurde bei 8 von 17 Klonen (47 %) gefunden, einseitige *scarless*-Insertionen traten in 13 von 17 Fällen (76 %) auf, beidseitige *scarless*-Insertionen wurden hingegen nicht beobachtet.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Insertionsgrößen reichen von 1198 bp (#1 A1, 2 & 4) bis hin zu 3851 bp (#2 A2, #2 B1 & 2), wobei die Größe der Insertion nicht mit der Vollständigkeit der inserierten Zielsequenz korreliert. Die Pm^R-Kassette war sowohl bei der Insertion von 1198 bp als auch jener von 3851 bp nicht komplett inseriert. Ob die Auswahl dabei auf ein Plasmid mit oder ohne *codon usage* optimierte Sequenz fiel, spielte dafür keine

Rolle. Beispielsweise wurde in den Klonen #1 A 3 & 5 eine dreimal so große Insertion (3601 bp) wie in den Klonen #1 A1, 2 & 4 (1198 bp) gefunden, obwohl in beiden Ansätzen der gleiche Donor (dAK_10, siehe Tabelle 3-1 Seite 56) genutzt wurde. Bei der Nutzung von plasmidären Reparatur-Donoren ist demnach eine Voraussage über Insertionslänge, Orientierung und Vollständigkeit der Zielsequenz nicht möglich, obgleich die Ausbeute an Klonen vergleichsweise hoch ist.

Tabelle 3.5.3-2: Darstellung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Targeteffizienzen erweitert um die Werte der Reparatur-Modus-Effizienz, $n = 3$; nummeriert sind die Transformationsansätze #1 - #4; A, B & C repräsentieren die verschiedenen Ansätze des Triplikats. Die DNA-Reparatur-Donore sind in Tabelle 3-1 auf Seite 56 aufgelistet. Eben dort sind auch die Transformationsansätze aufgeführt. dAK_10 ist ein Plasmid ohne homologe Bereiche, die Resistenzkassette ist *codon usage* optimiert; dAK_11 ist ebenfalls ein Plasmid ohne homologe Bereiche, die *codon usage* ist nicht optimiert; dAK_13 ist eine doppelsträngige linearisierte DNA ohne homologe Bereiche, die *codon usage* ist nicht optimiert. Die Targeteffizienz berechnet sich aus der Anzahl an CRISPR-Klone geteilt durch die Anzahl an Kolonien, die auf Selektionsmarker wachsen. Die Reparatur-Modus-Effizienz (RME) 1 berechnet sich aus der Anzahl an CRISPR-Klonen, welche die vollständige Resistenzkassette inseriert haben, RME 2 berechnet sich aus den CRISPR-Klonen, welche die vollständige Resistenzkassette inseriert haben und zusätzlich dazu keine weiteren Sequenzen aufweisen; jeweils geteilt durch die Anzahl an Kolonien, die auf Selektionsmarker wachsen.

| | SNRK2.2-Lokus (vorgelegte Arbeit) | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| DNA-Reparatur-Donor | dAK_10 | dAK_11 | dAK_13 |
| Piktogramm |  |  |  |
| Transformationsansatz | #1 | #2 | #4 |
| Arithmetisches Mittel der Kolonien auf Selektionsmarker, siehe Tabelle 3.2-1, Summe aus Pm ^R grün & blau | $\bar{x} = 130,03 \pm 16,2$ | $\bar{x} = 150,34 \pm 11,5$ | $\bar{x} = 139,67 \pm 9$ |
| CRISPR-Klone (Abbildung 3.2-2) | #1 A 1, 2, 3, 4, 5 B 1, 2 C 1, 2, 3 $\bar{x} = 3,33 \pm 1,53$ | #2 A 1, 2 B 1, 2 C 1 $\bar{x} = 1,67 \pm 0,58$ | #4 A 1 B 1 $\bar{x} = 0,67 \pm 0,58$ |
| Targeteffizienz [%] | $2,58 \pm 1,18$ | $1,11 \pm 0,38$ | $0,48 \pm 0,41$ |
| CRISPR-Klone mit vollständig inserierter Pm ^R -Kassette | #1 A 3, 5 B 1, 2 C 1, 2, 3 $\bar{x} = 2,33 \pm 0,58$ | - \bar{x} N/A | #4 A 1 B 1 $\bar{x} = 0,67 \pm 0,58$ |
| RME 1 (Pm ^R -Kassette ist vollständig) [%] | $1,8 \pm 0,45$ | 0 | $0,48 \pm 0,41$ |
| CRISPR-Klone mit vollständig inserierter Pm ^R -Kassette, keine Insertion weiterer Sequenzabschnitte | - | - | #4 A 1 B 1 $\bar{x} = 0,67 \pm 0,58$ |
| RME 2 (Pm ^R -Kassette ist vollständig, keine Insertion weiterer Sequenzabschnitte) [%] | 0 | 0 | $0,48 \pm 0,41$ |

Die obige Tabelle (Tabelle 3.5.3-2) zeigt die Targeteffizienzen, die sich aus der Anzahl an gefundenen CRISPR-Klonen dividiert durch die Anzahl an Kolonien, die auf Selektionsmedium wachsen, ergeben. Diese Werte wurden bereits in Tabelle 3.4-1 gezeigt. Sie spiegelt all jene Klone wieder, die, ungeachtet des eigentlichen Insertionsergebnisses, am targetierten Locus eine Mutation tragen. Für den Transformationsansatz #1 (Donor: Plasmid, ohne homologe Bereiche, *codon usage* optimiert) konnte dabei ein Wert von 2,58 %, für #2 (Donor: (Plasmid, ohne homologe Bereiche, nicht *codon usage* optimiert) von 1,11 % und für #4 (linearisierte, doppelsträngige Donor-DNA, ohne homologe Bereiche, ohne *codon usage* Optimierung) ein Wert von 0,48 % berechnet werden. Im Unterschied zu Tabelle 3.4-1 zeigt die hier abgebildete Tabelle 3.5.3-2 zusätzlich die Werte für die Reparatur-Modus-Effizienz (RME) 1 und 2. Für die Berechnung des RME 1 wurden lediglich jene CRISPR-Klone beachtet, deren Insertion die vollständige Resistenz-vermittelnde Kasette trugen. Diese besteht aus dem Doppelpromotor P_Hsp70 A des Hitzeschockproteins 70A, P_Rbcs2 der kleinen Untereinheit der RuBisCo, einem Intron der kleinen Untereinheit der RuBisCo, der codierenden Sequenz für das Enzym AphVIII (Aminoglycosid-3'-phosphotransferase VIII aus *Streptomyces rimosus*), welches die Resistenz gegen über Paromomycin vermittelt sowie einem Terminator der kleinen Untereinheit der RuBisCo. Um den Wert für RME 2 zu erhalten, wurden CRISPR-Klone gezählt, die zusätzlich zu diesem Kriterium keine weiteren Insertionen, sei es Teile des Vektorrückgrades oder Fragmente deren Ursprung nicht vom Donor herrührt, aufwiesen. Zur Berechnung der Targeteffizienz wurden also alle 17 Klone verrechnet, für RME 1 kamen die Klone #1 A3, 5, B1 & 2, C1, 2 & 3 mit einem Wert von 1,8 % sowie die Klone aus Transformationsansatz #4 mit einem Wert von 0,48 % zum Tragen. Die Klone #1 A1, 2 & 4 (Ergebnis der Sequenzierung siehe Abbildung 3.5.2-3) konnten hier nicht eingehen, da die Resistenz-vermittelnde Kasette nur zu einem Bruchteil inseriert wurde. Die Diskussion dazu findet sich in Kapitel 4.1.2, Unterkapitel „Unvollständige Insertion der Genkasette“, S. 118. Im Transformationsansatz #2 zeigten Verkürzungen der Kasette im Bereich des Doppelpromotors, weshalb sie bei der Berechnung der RME 1 nicht eingehen konnten. Die Klone, welche aus Transformationsansatz #4 hervorgingen, konnten berücksichtigt werden (siehe Abbildung 3.5.2-10). Für die Berechnung des RME 2 wurden ebenfalls die Klone aus dem Transformationsansatz #4 verrechnet (0,48 %). Nur hier wurde eine präzise (am targetierten Locus, keine Insertion zusätzlicher Fragmente) und vollständige (Kasette ist vollständig) Insertion gefunden.

3.6 Untersuchung der Insertionsfrequenz mittels Southern Blot

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass mit plasmidären Donoren die höchste Anzahl an CRISPR-Klonen generiert werden kann (Kapitel 3.4 Targeteffizienz), jedoch eine präzise und vollständige Insertion nur mittels linearisierter doppelsträngiger DNA gelang (Kapitel 3.5 Reparatur-Modus-Effizienz). Um zu untersuchen, ob Insertionen der Resistenz-vermittelnden Kasette auch „*Off-target*“, also außerhalb der mittels CRISPR/Cas adressierten Spaltstelle erfolgten, wurde das Genom von *C. reinhardtii* mittels Southern Blot analysiert.

Bei dieser klassischen Methode (siehe Material und Methodenteil, Kapitel 2.2.13) wird die genomische DNA der Transformanten mit Hilfe eines Restriktionsenzym in Fragmente geschnitten, welche anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Nach dem Transfer auf eine Membran und Behandlung mit alkalischer Pufferlösung zur Generierung von Einzelsträngen erfolgt die Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer *codon usage* optimierten und einer nicht *codon usage* optimierten Sequenz der Paromomycin-Resistenz gearbeitet. Deren Nachweis sollte mit jeweils einer entsprechenden Sonde für die jeweilige Sequenz erfolgen. Als Restriktionsenzym wurde PvuII gewählt. In Abbildung 3.6-1 A & 3.6-2 A ist der Bereich der Bindung visualisiert. Sonde 1 bindet an der *codon usage* optimierten Resistenz-vermittelnden Sequenz (Pm^R), welche in Transformationsansatz #1 genutzt wurde. Diese Sonde wurde mit den Primern prAK_123 & prAK_124, wie in Kapitel 2.2.13 im Material- und Methodenteil beschrieben, hergestellt. Sonde 2 bindet die nicht *codon usage* optimierte Pm^R Sequenz und wurde mit den Primern prAK_71 & prAK_122 hergestellt. In der Abbildung sind die Bereiche der Pm^R-Resistenzkasette wie folgt visualisiert: Doppel-Linie: DNA-Doppelstrang, pflaum-farbener Pfeil: Doppelpromotor, bestehend aus dem Promotor (P) für das Hitzeschockprotein 70 A (Hsp70A) und dem Promotor für die kleine Untereinheit der Ribolose-bisphosphat-carboxylase (Rbcs2), hellblauer Pfeil: Pm^R-Sequenz in entsprechender *codon usage*, codiert für das Enzym AphVIII (Aminoglycosid-3'-phosphotransferase aus *Streptomyces rimosus*), gestrichelte Linie: Intron, dunkel blauer Balken: Terminator (T) der Rbcs2; die Primer sind als lila-farbene Linien gekennzeichnet, der Bereich der Sonde ist in orange dargestellt. Ziel der Southern Blot Analyse war, die Frequenz der Insertion der Paromomycin-Resistenz-vermittelnden Sequenz zu untersuchen. Es fällt auf, dass der Bindungsbereich von Sonde 1 und 2 unterschiedlich ist. Während Sonde 1 den Promotor und den Beginn der Pm^R-Sequenz abdeckt, bindet Sonde 2 fast die gesamte Pm^R-Sequenz. Dieser Unterschied liegt in der unterschiedlichen Sequenzabfolge begründet: in der *codon usage* optimierten Variante ist die Pm^R-Sequenz

durch PvuII-Restriktionsstellen unterbrochen, dies ist bei der nicht *codon usage* optimierten Sequenz nicht der Fall.

Für einen Überblick über die hier analysierten CRISPR-Klone sei an dieser Stelle auf die Abbildung 3.2-3 Seite 62 verwiesen. In Tabelle 3.5.3-1 Seite 97 finden sich der Überblick über die Details der Insertionen an der Doppelstrangbruchstelle im *SNRK2.2*-Lokus.

Zunächst wurden die CRISPR-Klone des Transformationsansatzes #1 untersucht. Bei diesem Ansatz wurde mit plasmidärer doppelsträngiger Donor-DNA, *codon usage* optimiert, gearbeitet. Die Bindestelle der Sonde ist in Abbildung 3.6-1 A, das Ergebnis der Southern Blot-Analyse ist in Abbildung 3.6-1 B gezeigt. A, B & C stehen dabei für die unterschiedlichen Versuchsdurchgänge (Triplikate), die erhaltenen Klone sind fortlaufend nummeriert.

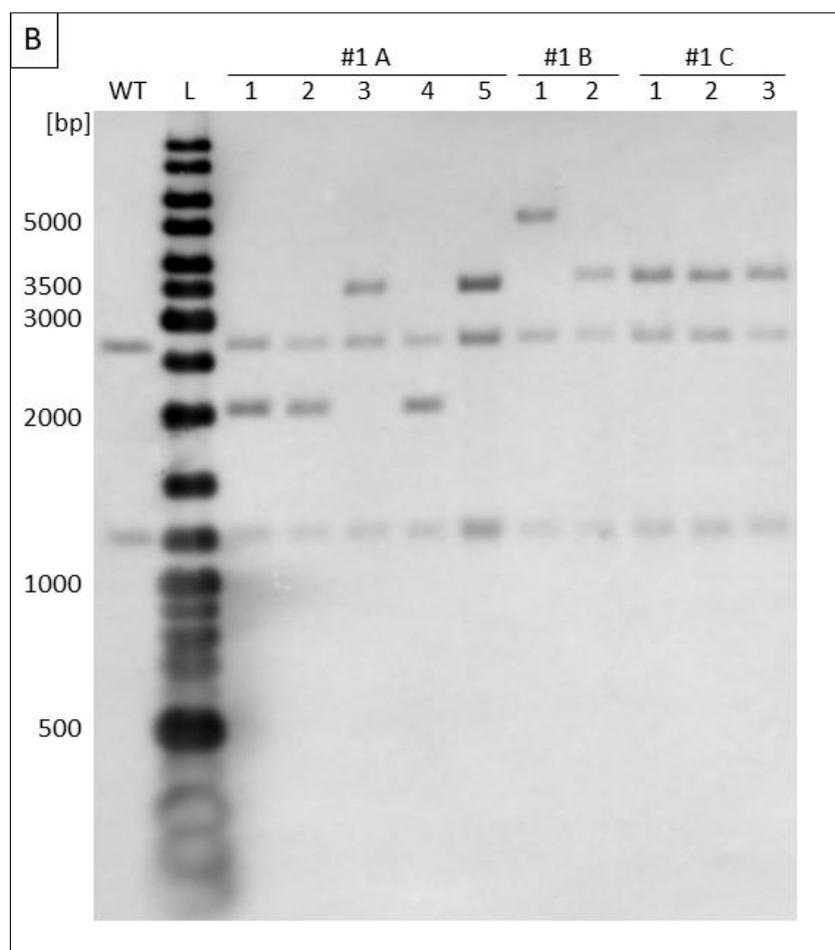
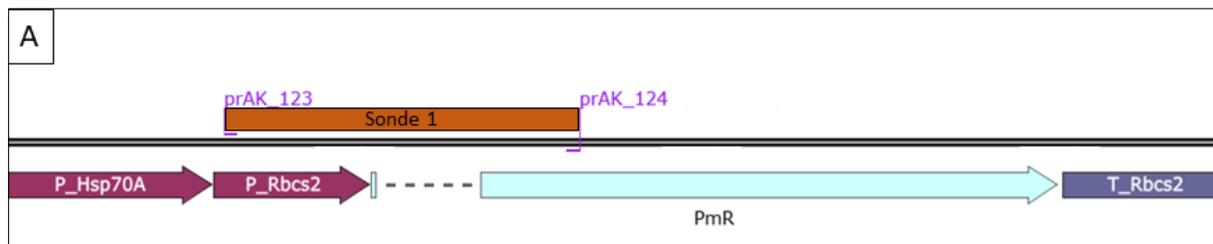


Abbildung 3.6-1 A: Darstellung der Sonde 1 (Länge der Sonde: 500 bp) für die *codon usage* optimierte Paromomycin-Resistenz vermittelnde Sequenz (Pm^R), die Primer prAK_123 & prAK_124 für die Sondenherstellung sind als lila-farbenen Linien markiert; in der Abbildung sind die Bereiche der Pm^R-Resistenzkassette wie folgt visualisiert: Doppel-Linie: DNA-Doppelstrang, pflaum-farbener Pfeil: Doppelpromotor, bestehend aus dem Promotor (P) für das Hitzeschockprotein 70 A (Hsp70A) und dem Promotor für die kleine Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-carboxylase (Rbcs2), hellblauer Pfeil: Pm^R-Sequenz, gestrichelte Linie: Intron, dunkel blauer Balken: Terminator (T) der Rbcs2; der Bereich der Sonde ist in orange dargestellt; B: Ergebnis der Southern Blot-Analyse der CRISPR-Klone #1 A1 bis #1 C3 (DNA-Reparatur-Donor: dAK_10, Plasmid, doppelsträngig, *codon usage* optimiert), als Kontrolle wurde der WT mitgeführt, L: GeneRuler DNA LadderMix, Thermo SM0331; verdaut wurden 10 µg Gesamtzell-DNA mit PvuII, die Entwicklung des Blots erfolgte mit NBT-BCIP®.

Das Ergebnis der Southern Blot Analyse für die CRISPR-Klone aus dem Transformationsansatz #1 zeigte, dass mehrere Signale pro Klon detektiert werden konnten. Klon #1 A1, 2 und 4 zeigten dabei Signal auf Höhe von 1200, 2200 & 2600 Basenpaaren, für die Klone #1 A 3 & 5 wurden auf Höhe von 1200, 2600 und 3500 Basenpaaren Signale erhalten. Der Klon #1 B1 zeigte Fragmente der Größe 1200, 2600 & 5200 Basenpaare. Für die Klone #1 B 2 sowie #1 C 1-3 konnten Signale bei 1200, 2600 & 3800 Basenpaaren detektiert werden. Diese Signale entsprechen den, durch den Verdau mit PvuII erhaltenen Fragmenten, auf denen die Sonde binden konnte. Auffällig ist, dass alle Klone Signale bei 1200 & 2600 Basenpaaren aufwiesen. Als Kontrolle wurde eine Probe wildtypischer DNA aufgetragen (Abbildung 3.6-1 B erste Spur). Auch diese zeigte die Fragmente von 1200 & 2600 Basenpaaren. Auf Grund dieser Beobachtung handelt es sich bei diesen Fragmenten um das Ergebnis einer unspezifischen Bindung der Sonde mit Fragmenten der wildtypischen genomischen DNA der Klone und wird deshalb nicht weiter betrachtet. Interessant hingegen sind die Fragmente, welche zusätzlich zu diesen detektiert wurden, da diese die Insertion anzeigen. Aus den Ergebnissen der Sequenzierung ist die Länge und Art der Insertion am Locus bekannt (siehe Abbildungen 3.5.2-3 - 6 Kapitel 3.5.2). *In silico* war so eine Vorhersage über die zu erwartende Fragmentgröße nach PvuII-Verdau der genomischen DNA möglich. Die gefundenen Fragmente entsprechen den Erwartungen, mit Ausnahme der Transformanten #1 A1, 2 und 4. Unter der Annahme, dass der Verdau vollständig war, hätte man ein Fragment von 1028 bp erwartet. Da ein Fragment größerer Länge gefunden wurde, liegt die Vermutung nahe, dass der Verdau in den drei Experimenten unvollständig war.

Klone, deren Reparatur zur identischen Insertion führten, zeigten im Blot entsprechend ein identisches Bandenmuster. In Tabelle 3.6-1 sind die Ergebnisse des Blots noch einmal aufgeführt, wobei in grau die wildtypischen Banden und in grün die erwarteten Fragmente visualisiert sind.

Für alle Klone aus dem Transformationsansatz #1 gilt: Da neben den Fragmenten, welche auch im Wildtyp detektiert werden konnten und jenen, welche für die Insertion im *SNRK2.2*-Locus erwartet wurden, keine weiteren Fragmente detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass eine einmalige Insertion am Ziellocus erfolgte. Dies gilt zumindest für den

Teil, der von der Sonde abgedeckt wird, auch wenn dieser Teil alleine nicht für eine Funktionalität reicht.

Tabelle 3.6-1: Übersicht der im Southern Blot gefundenen Fragmente für den Transformationsansatz #1, Donor: Plasmid, doppelsträngig, *codon usage* optimiert; Farbcode: grau: wildtypisch, grün: erwartete Fragmentgrößen nach Verdau mit PvuII im *SNRK2.2*-Lokus.

| Probe | Klon | 5200 bp | 3800 bp | 3500 bp | 2600 bp | 2200 bp | 1200 bp |
|-------|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| WT | | | | | X | | X |
| #1 A | 1 | | | | X | X | X |
| | 2 | | | | X | X | X |
| | 3 | | | X | X | | X |
| | 4 | | | | X | X | X |
| | 5 | | | X | X | | X |
| #1 B | 1 | X | | | X | | X |
| | 2 | | X | | X | | X |
| #1 C | 1 | | X | | X | | X |
| | 2 | | X | | X | | X |
| | 3 | | X | | X | | X |

In einem weiteren Experiment wurden die Klone untersucht, welche mit nicht *codon usage* optimierten Donor-Sequenzen transformiert worden waren. Abbildung 3.6-2 A visualisiert die Bindestelle der hier eingesetzten Sonde, Abbildung 3.6-2 B zeigt das Ergebnis des Blots. Im Transformationsansatz #2 wurde mit plasmidärer doppelsträngiger Donor-DNA gearbeitet, im Transformationsansatz #4 wurde doppelsträngige linearisierte Donor-DNA genutzt. Auch hier wurde als Kontrolle eine Wildtyp-Probe aufgetragen. A, B & C stehen dabei für die unterschiedlichen Versuchsdurchgänge (Triplikate), die Klone an sich sind fortlaufend nummeriert.

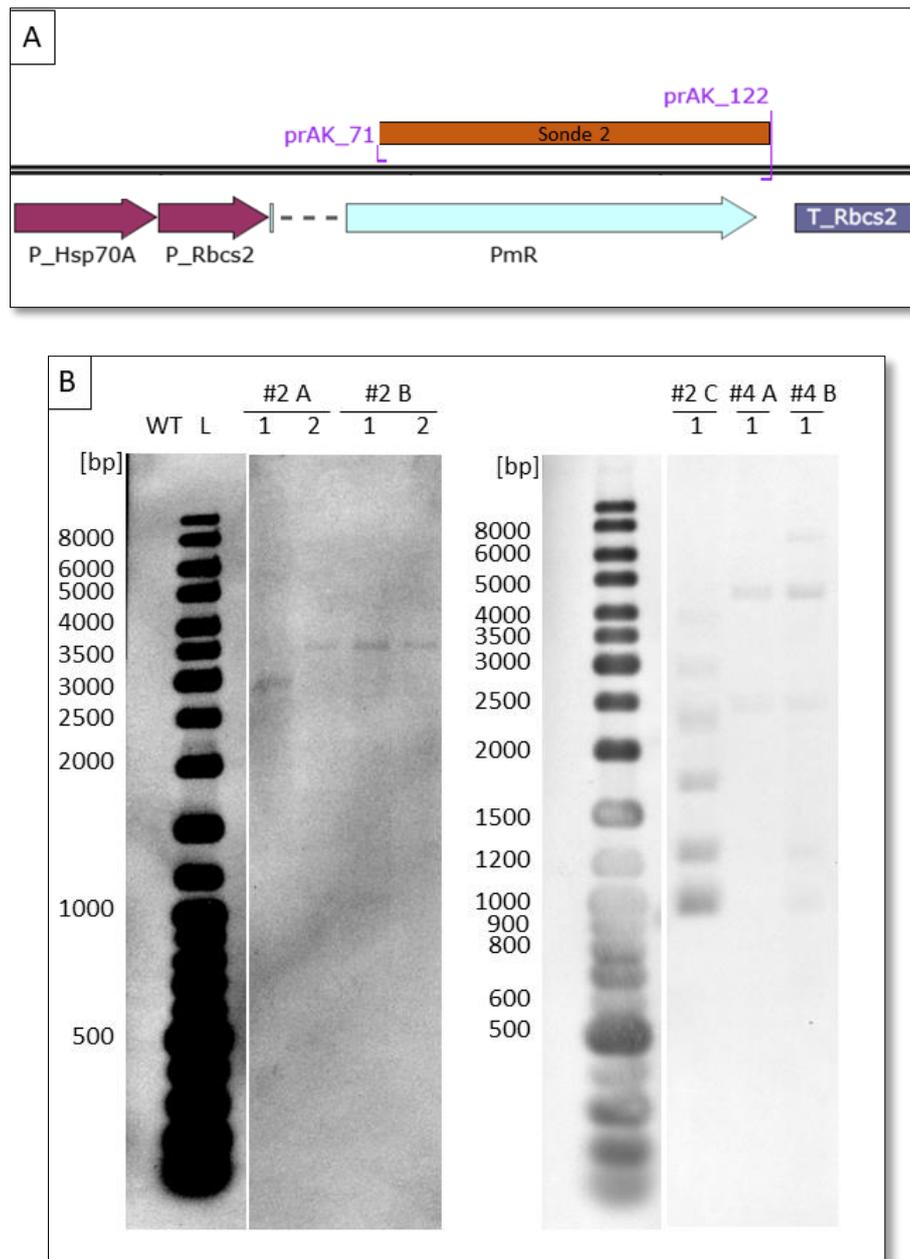


Abbildung 3.6-2 A: Darstellung der Sonde 2 (Länge der Sonde: 785 bp), für die nicht *codon usage* optimierte Paromocycin-Resistenz vermittelnde Sequenz (Pm^R), die Primer *prAK_71* & *prAK_122* für die Sondenherstellung sind als lila-farbenen Linien markiert; in der Abbildung sind die Bereiche der Pm^R -Resistenzkassette wie folgt visualisiert: Doppel-Linie: DNA-Doppelstrang, pflaum-farbener Pfeil: Doppelpromotor, bestehend aus dem Promotor (P) für das Hitzeschockprotein 70 A (Hsp70A) und dem Promotor für die kleine Untereinheit der Ribolose-bisphosphat-carboxylase (Rbcs2), hellblauer Pfeil: Pm^R -Sequenz, gestrichelte Linie: Intron, dunkel blauer Balken: Terminator (T) der Rbcs2; der Bereich der Sonde ist in orange dargestellt ; B: Ergebnis der Southern Blot-Analyse der CRISPR-Klone #2 A1 bis #4 B1 (DNA-Reparatur-Donor #2: dAK_11, Plasmid, doppelsträngig, nicht *codon usage* optimiert; #4: dAK_13, linearisierte DNA, doppelsträngig, nicht *codon usage* optimiert), als Kontrolle wurde der WT mitgeführt, L: GeneRuler DNA LadderMix, Thermo SM0331; verdaut wurden 10 μ g Gesamtzell-DNA mit PvuII, die Entwicklung des Blots erfolgte mit NBT-BCIP®.

Vergleicht man die Signalintensitäten, welche mit Sonde 1 (Abbildung 3.6-1 B) und Sonde 2 (Abbildung 3.6-2 B) erzielt werden konnten, so fällt ein deutlicher Unterschied auf: die Signale von Sonde 2 sind deutlich schwächer. Dieser Umstand erschwert die Auswertung. Tabelle 3.6-

2 zeigt alle gefundenen Signale, die auf dem Original Blot besser zu identifizieren waren als auf der Abbildung in der vorliegenden Arbeit.

Es zeigte sich, dass auch mit Sonde 2 mehrere Banden für die einzelnen Klone aus Transformationsansatz #2 (Donor: Plasmid, nicht *codon usage* optimiert, ohne homologe Bereiche) & Transformationsansatz #4 (Donor: linearisierte DNA, nicht *codon usage* optimiert, ohne homologe Bereiche) identifiziert werden konnten. Im Unterschied zum Ergebnis des Blots aus Transformationsansatz #1 (Donor: Plasmid, *codon usage* optimiert, ohne homologe Bereiche, siehe Abbildung 3.6-1 B) mit Sonde 1 konnte jedoch in der WT-Kontrolle keine unspezifische Bindung der Sonde festgestellt werden. Alle mit Sonde 2 detektieren Banden spiegeln also eine Insertion der Zielsequenz wieder. *In silico* war es möglich, mit Hilfe der Ergebnisse der Sequenzierung (siehe Abbildung 3.5.2-3 - 10) Fragmentgrößen für die Insertion im *SNRK2.2*-Lokus vorauszusagen. Die Fragmente konnten mit Hilfe des Southern Blots gefunden werden, in Tabelle 3.6-2 sind diese grün markiert. Alle weiteren im Southern Blot detektieren Signale sind ebenfalls in Tabelle 3.6-2 gelistet, jedoch in rot markiert. Diese Fragmente entsprechen nicht der Insertion im *SNRK2.2*-Lokus. Sie stellen ungerichtete, und für die vorliegende Arbeit unbeabsichtigte, Insertionen an unbekannter Stelle im Genom dar. Sie können das Ergebnis einer klassischen Insertion sein, welche ohne die Zugabe einer Nuklease im Transformationsansatz funktioniert oder sogenannte *Off-targets* der Cas9 sein, welche in Kapitel 4.2 diskutiert werden.

Für den Klon #2 A konnte eine prominente Bande bei 3000 Basenpaaren identifiziert werden, außerdem eine deutlich schwächere Bande bei 5500 Basenpaaren. Das Fragment der Größe 3000 Basenpaaren entspricht der Erwartung (berechnet wurden 3104 Basenpaare) das größere Fragment von 5500 Basenpaaren konnte nicht der Insertion im *SNRK2.2*-Lokus zugeordnet werden. Die Klone #2 A 2 sowie #2 B 1 & 2 zeigten bei der Sequenzierung eine identische Insertion. Im *SNRK2.2*-Lokus wurde ein Fragment der Größe 3518 Basenpaare erwartet und gefunden (siehe grüne Markierung Tabelle 3.6-2, 3500 bp). Weiterhin konnten Signale bei 3200 & 2800 Basenpaare detektiert werden, jedoch deutlich schwächer als die Bande bei 3500 Basenpaaren. Für Klon #2 C 1 wurde ebenfalls das erwartete Fragment von 3518 Basenpaaren gefunden, dabei handelte es sich jedoch nicht um eine prominente Bande, im Gegenteil zeigte sich das Signal auf der erwarteten Höhe besonders schwach. Deutlicher sind hingegen Fragmente, deren Insertionsort unbekannt geblieben ist: 4000, 2800, 2200, 1700, 1300 sowie 1000 Basenpaare. Die unterschiedliche Bandenintensität kann auf die Bindungsstärke der Sonde begründet liegen.

Die Ergebnisse der Sequenzierung im *SNRK2.2*-Lokus zeigten eine identische Insertion für die Klone #4 A1 & #4 B1 (siehe Abbildung 3.5.2-10). Es wurde ein Fragment von 4500

Basenpaaren für die Klone des Transformationsansatzes #4 erwartet. Dieses konnte im Southern Blot nachgewiesen werden und trat als prominente Bande in Abbildung 3.6-2 B auf. Auch hier wurden neben der erwarteten Bande weitere Signale identifiziert: 7000, 2500, 1300 & 1000 Basenpaare. Die Signale waren deutlich schwächer und zeigen Insertionen, die nicht im *SNRK2.2*-Lokus liegen.

Tabelle 3.6-2: Übersicht der im Southern Blot gefundenen Fragmente für den Transformationsansatz #2 & #4, Donor #2: Plasmid, doppelsträngig, nicht *codon usage* optimiert, Donor #4: linearisiert, doppelsträngig, nicht *codon usage* optimiert; Farbcode: grün: erwartete Fragmentgrößen nach Verdau mit PvuII im *SNRK2.2*-Lokus, rot: gefundene Fragmentgröße, die nicht auf die Insertion im *SNRK2.2*-Lokus zurückzuführen ist.

| Probe | Klon | 7000 bp | 5500 bp | 4500 bp | 4000 bp | 3500 bp | 3200 bp | 3000 bp | 2800 bp | 2500 bp | 2200 bp | 1700 bp | 1300 bp | 1000 bp |
|-------|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| WT | | | | | | | | | | | | | | |
| #2 A | 1 | | X | | | | | X | | | | | | |
| | 2 | | | | | X | X | | X | | | | | |
| #2 B | 1 | | | | | X | X | | X | | | | | X |
| | 2 | | | | | X | X | | X | | | | | |
| #2 C | 1 | | | | X | X | | | X | | X | X | X | X |
| #4 A | 1 | X | | X | | | | | | X | | | X | X |
| #4 B | 1 | X | | X | | | | | | X | | | X | X |

Die Vielzahl an Fragmenten, die sich bei der Analyse der Klone zeigte, welche mit nicht *codon usage* optimierter Donore (Sonde 2) zeigte, steht im Gegensatz zu den Resultaten der Proben, welche mit *codon usage* optimierter Sequenz (Sonde 1) behandelt wurden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es bei der Verwendung von nicht *codon usage* optimierten Donoren zu Mehrfachinsertionen kommen kann und lässt vermuten, dass die Verwendung *codon usage* optimierter Donore zu Einfachinsertionen führt. Jedoch zeigte sich bei der Sequenzierung (siehe Abbildung 3.5.2-3), dass die Pm^R-Kassette nur unvollständig inserierte und damit die Bildung eines funktionalen AphVIII (Aminoglycosid-3-phosphotransferase, siehe Kapitel 1.1.6 der Einleitung) nicht möglich ist. Dies lässt darauf schließen, dass der C-terminale Teil, welcher von der Sonde 1 nicht abgedeckt wird, anderswo inserierte und eine enzymatische Reaktion ermöglicht. Eine abschließende Aussage zu Mehrfachinsertionen mit *codon usage* optimierten Donoren ist deshalb nicht möglich.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* (im Folgenden als *C. reinhardtii* genannt) gearbeitet. Die Arbeit mit einem phototrophen Organismus macht die Nutzung von CO₂ zur biotechnologischen Stoffproduktion möglich. Die molekularbiologischen Werkzeuge sind jedoch unzureichend, um eine gezielte Insertion von Fremdgenen zu ermöglichen, welche eben jene Stoffproduktion ermöglichen. Deshalb waren Untersuchungen zur Integration von einer funktionalen Genkassette ins Kerngenom Ziel dieser Arbeit.

Dazu sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Art der DNA-Reparatur-Donore, im Folgenden als Donore bezeichnet, auf die Integration im Kerngenom der Mikroalge hat. Dazu sollte mittels des *tools* CRISPR/Cas das Kerngenom editiert werden und die zelleigenen Reparaturmechanismen aktiviert werden. Als Donore für die zelleigene Reparatursmechanik von *C. reinhardtii* wurden A) zirkuläre, ungeschnittene Plasmide, B) doppelsträngige Fragmente & C) einzelsträngige Fragmente genutzt, die Sequenzen waren z.T. *codon usage* optimiert. Es wurde zudem untersucht, ob mittels flankierender homologer Bereiche auf der Donor-Sequenz eine Reparatur über den Mechanismus der HR (homologe Rekombination) am Übergang der G1 zu S-Phase (Zellzyklus, siehe Material- und Methodenteil Kapitel 2.2.2) gefördert werden kann. Als Modellsystem kam, nach Vorbildern aus der Literatur, eine Resistenz-vermittelnde Genkassette zum Einsatz. Diese codiert für das Enzym Aminoglycosid-3'-phosphotransferase (AphVIII) und vermittelt die Resistenz gegen Paromomycin (Pm^R). Der in der vorliegenden Arbeit targetierte Genloкус ist der *SNRK2.2*-Lokus, dessen Mutation mit Hilfe des Substrats „XSO₄“ durch eine Blaufärbung nachzuweisen ist (siehe Material- und Methodenteil, Kapitel 2.2.8). Die Nutzung dieser Kassette stellte einen *proof-of-concept* Versuch dar. Er liefert die Grundlage für die Integration mehrerer Gene, auf denen gegebenenfalls ganze Stoffwechselwege codiert sein können.

Bei der Verwendung von Plasmiden als Donor für die Reparatur in *C. reinhardtii* Insertionen von bis zu 2650 Basenpaaren [Shin et al., 2016]. Mit kurzen Donor-Sequenzen (20 – 40 nt) wurden einzelsträngige und doppelsträngige Donore mit dem Ziel des *knock outs* genutzt [Ferenczi et al., 2017; Greiner et al., 2017]. Eine Nutzung von linearisierten doppel- oder gar einzelsträngigen Donoren wurde in anderen Systemen, z.B. der murinen und humanen Zellkultur [Wang et al., 2015; Li et al., 2017; Quadros et al., 2017; Tasan et al., 2018; Yu et al., 2020] publiziert (siehe Tabelle 1.1.4.4-1 der Einleitung Seite 16). In wie weit diese in der Mikroalge Anwendung finden können, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, da es einen solchen umfassenden Vergleich in der Literatur bisher nicht gab. Dabei kam es nicht

nur darauf an, den targetierten Locus im Kerngenom der Alge zu mutieren, sondern es sollte genau untersucht werden, was an der Schnittstelle passiert und in wie weit die Insertion eines *proof-of-concept inserts* vollständig, präzise und effizient gelingen kann. Ziel der Betrachtung war außerdem die Untersuchung auf mögliche unbeabsichtigte Mehrfachinsertionen, sog. *Off-targets*.

4.1 Einordnung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Selektionsfrequenzen und Effizienzen in die Literatur

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Geneditierung in *C. reinhardtii* mittels CRISPR/Cas etabliert. Dafür war zunächst die Ermittlung der Selektionsfrequenzen und Effizienzen nötig, um eine Einordnung der gewonnenen Daten in die Literatur zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die Klone nach der Transformation ausgezählt.

Bei der Auszählung der auf Selektionsmedium gewachsenen Klone traten nach dem Farbttest (siehe Material- und Methodenteil, Kapitel 2.2.8) drei verschiedene Phänotypen (siehe Abbildung 3.2-1 Seite 60) hervor: Klone, die grüne Kolonien bildeten („Pm^R grün“), Kolonien, die im Farbttest eine blaue Färbung zeigten („Pm^R blau“) und als CRISPR-Klone identifiziert wurden; sowie Kolonien, die zunächst grün aussahen, nach 10 – 15 Tagen jedoch eine gelbliche Färbung aufwiesen („Pm^R gelb“). Dieser Phänotyp wurde unabhängig von der Verwendung des RNP-Komplexes gefunden. Die Anzahl der Phänotypen „Pm^R grün“ und „Pm^R blau“, folgend als CRISPR-Klone oder Klone bezeichnet, ging in die Berechnung der Selektionsfrequenzen und Effizienzen (siehe Kapitel 3.2ff) ein, die Diskussion dazu findet sich in Kapitel 4.1.1 – 4.1.2.

Der Verlust der grünen Farbe nach 10 – 15 Tagen bei der Gruppe der phänotypisch gelb erscheinenden Kolonien („Pm^R gelb“) zeigte einen Abbau des Chlorophylls und ließ vermuten, dass die Zellen abgestorben waren. Diese Vermutung bestätigte sich, nachdem ein Subkultivierung nicht gelang. Aus diesem Grund wurden diese Kolonien in den Berechnungen für die Effizienzen nicht berücksichtigt. Durch stets mitgeführte Vitalitätskontrollen durch Ausplattieren von transformierten Zellen auf Platten ohne Selektionsdruck bei denen keine gelben Klone gefunden wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Kolonien „Pm^R gelb“ um ein generelles Problem der zu transformierenden Zellchargen handelte.

Absterbende Zellen nach der Transformation sind in der Literatur nicht beschrieben. Das Auftreten dieses Phänotyps unabhängig von der Anwesenheit des RNP-Komplexes lässt auf ungerichtete Insertions-Ereignisse schließen. Vermutlich inserierte die gegen Paromomycin Resistenz-vermittelnde Kasette, fortan als Pm^R-Kasette bezeichnet, in einem Bereich der

genomischen DNA (gDNA), dessen *knock out* nach einer bestimmten Zeitspanne für die Zellen letal ist. Diese Klone wurden nicht weiter untersucht, sodass die Gründe für das verzögerte Absterben unbekannt bleiben. Von einer transienten Resistenz gegenüber Paromomycin ist nicht auszugehen, da der Zelltod erst nach 10 – 15 d beobachtet wurde. Die Generationszeit von *C. reinhardtii* ist mit 6-8 h jedoch deutlich kürzer.

4.1.1 Selektionsfrequenz & -effizienz

Nach der Transformation der *C. reinhardtii*-Zellen mit den unterschiedlichen Donoren sowie dem Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex (Transformationsansätze #1, #2, #4, #6, #8 sowie #10 & #11, siehe Abbildung 4.1.1-1) wurden die Transformationsansätze jeweils auf Selektionsmedium ausplattiert. Als Kontrollen wurden die Transformationsansätze #3, #5, #7 und #9 ohne RNP-Komplex behandelt. Um die Selektionsfrequenz zu berechnen, wurden die Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) auf dem Selektionsmedium ausgezählt und durch die Zellzahl, die in der Transformation eingesetzt worden war, dividiert [Greiner et al., 2017; Shin et al., 2016].

Zu Beginn des 3. Kapitels Ergebnisse sind die Donore beschrieben, welche in den verschiedenen Transformationsansätzen genutzt wurden. In Transformationsansatz #1 wurde mit einem Donor gearbeitet, dessen Sequenz *codon usage* optimiert war, der über keine homologen Bereiche verfügte und der plasmidär war. In allen anderen Transformationsansätzen wurde mit einer nicht *codon usage* optimierten Sequenz gearbeitet. In Transformationsansatz #2 & #3 wurde mit einem Plasmid ohne homologe Arme transformiert, in #4 & #5 kam eine linearisierte doppelsträngige DNA als Donor hinzu, ohne homologe Bereiche; bei #6 & #7 handelte es sich ebenfalls um eine linearisierte doppelsträngige DNA, jedoch mit homologen Bereichen; ein Plasmid mit homologen Bereichen wurde in den Ansätzen #8 & #9 verwendet. In den Transformationsansätzen #10 & #11 kam jeweils eine einzelsträngige DNA mit homologen Bereichen zum Einsatz.

Die Selektionsfrequenz gibt einen ersten Eindruck des Transformationsergebnisses wieder. Rückschlüsse auf der Art der Insertion können an dieser Stelle nicht getroffen werden, da ein Wachstum auf dem Selektionsmedium nicht bedeutet, dass ein Einbau der Pm^R-Kassette an der vorgesehenen Stelle im Genom passiert ist. Es bedeutet lediglich, dass die Resistenzvermittelnde Sequenz im Genom eingebaut wurde. Die hier betrachteten KBEs können Produkt einer ungerichteten und/oder gerichteten Einfach- oder Mehrfachinsertion sein.

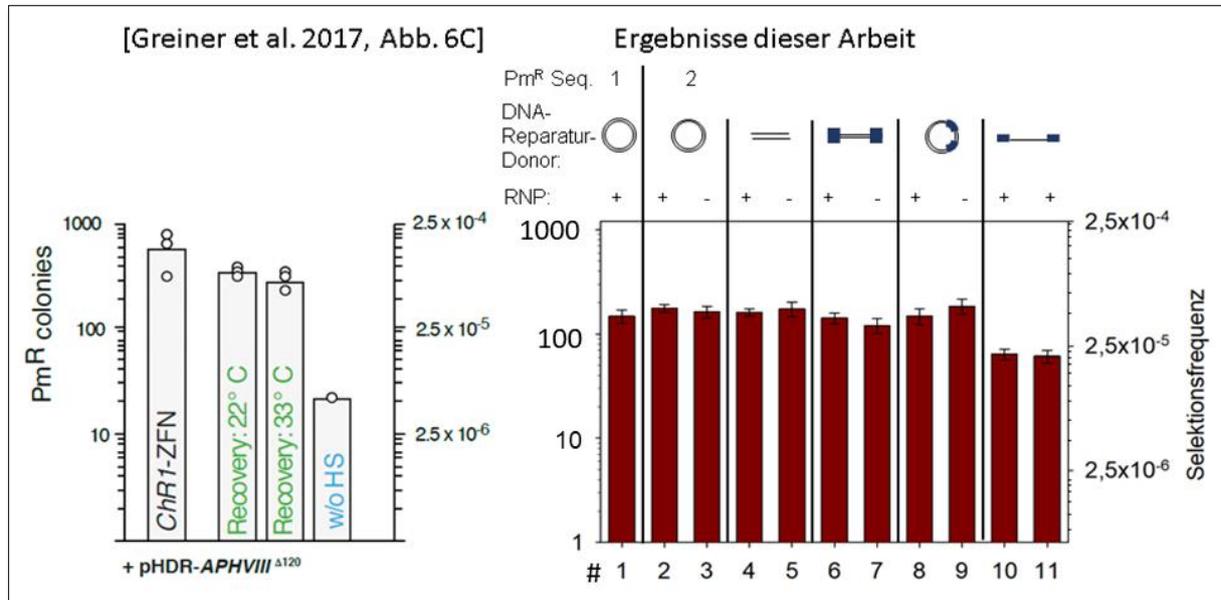


Abbildung 4.1.1-1: Gegenüberstellung der in der Arbeit von A. Greiner publizierten Selektionsfrequenzen [Greiner et al., 2017] mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte (Wertetabelle: 3.2-1). Halblogarithmische Darstellung der Selektionsfrequenzen bezogen auf die Gesamtzellanzahl bei der Transformation. Die publizierten Daten zeigen das Ergebnis der KBE-Zählung des Versuches den künstlich eingebrachten *mut-APHVIII* Locus des Rezipientenstamms CC-3403-GTS3 zu komplementieren, verwendete Reparatur-Donor-DNA: pHDR-APHVIII^{Δ120}; ChR1-ZFN: Vergleichswert aus vorangegangenen Experimenten (ChR1: Channelrhodopsin 1, ZFN: Zinkfinger-nuklease); Vgl. der Selektionsfrequenz bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen nach der Transformation (22 oder 33 °C) bzw. dem vorherigen Behandeln der Zellen mit Hitzeschock (HS); Die Art der jeweils genutzten Donore der vorliegenden Arbeit ist in Tabelle 3-1 Seite 56 im Ergebnisteil anzulesen. Es wurden *codon usage* optimierte (1) und nicht optimierte (2) Sequenzen genutzt, es wurden Plasmide (Transformationsansatz #1, 2, 8 & 9), doppelsträngige linearisierte (Transformationsansatz #4, 5, 6 & 7) und einzelsträngige linearisierte Donore (Transformationsansatz #10 & 11) genutzt, mit (Transformationsansatz #1 – 5) und ohne (Transformationsansatz #6 - 7) homologe Bereiche. Als Kontrollen wurden Transformationsansätze ohne (-) RNP durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n = 3.

Selektionsfrequenzen wurden in der Literatur von Greiner et al. und Shin et al. für die Mikroalge *C. reinhardtii* ermittelt. In Abbildung 4.1.1-1 sind die Selektionsfrequenzen der in der Arbeit von Greiner et al. den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt [Greiner et al., 2017]. Die Achsenskalierung wurde für eine direkte Vergleichbarkeit der Abbildung der Publikation angepasst.

Die Abbildung 4.1.1-1 links stellt die Selektionsfrequenz der Versuche im künstlich eingebrachten *mut-APHVIII* Locus des Rezipientenstamms CC-3403-GTS3 dar, wobei dieser Locus mit Hilfe von Nukleasen komplementiert werden sollte [Greiner et al., 2017]. Auch dieser Versuch diente der Methodenetablierung. Es wurden dazu Versuche mittels Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) und Versuche mittels der Cas9-Nuklease inkl. DNA-Reparatur-Donoren (pHDR-AphVIII^{Δ120}; HDR: Homology-Directed Repair; AphVIII: kodiert für die Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase Typ VIII) bei verschiedenen Inkubationstemperaturen nach der Transformation bzw. einer Vorbehandlung mit Hitzeschock (HS) untersucht. In den Versuchen

mittels Cas9 und HS wurde eine Selektionsfrequenz von durchschnittlich $7,5 \cdot 10^{-5}$ gefunden (300 Kolonien auf Selektionsmedium von 4 Mio in der Küvette eingesetzter Zellen). Hierbei wurde ein Plasmid (doppelsträngig und zirkulär) als DNA-Reparatur-Donor eingesetzt.

Die Selektionsfrequenzen der Ansätze, bei denen mit plasmidären bzw. doppelsträngig linearisierten Donoren gearbeitet wurde liegen zwischen $3,64$ und $5,01 \cdot 10^{-5}$ (Mittelwert $4,55 \cdot 10^{-5}$). Diese Ergebnisse liegen nur geringfügig unter den Werten der Literatur ($7 - 12 \cdot 10^{-5}$) [Greiner et al. 2017]. Die Werte der Ansätze, bei denen mit einzelsträngigen DNA-Reparatur-Donoren gearbeitet wurde, sind mit einem Durchschnittswert von $2,1 \cdot 10^{-5}$ um den Faktor 2 geringer.

Auch in einer Publikation von Shin et al. wurden Komplementationsstudien beschrieben, wobei zusätzlich Plasmide, welche eine Resistenzkassette tragen, co-transformiert wurden [Shin et al., 2016]. Die dabei ermittelten Werte schwanken, je nach targetierten Locus und eingesetzter Stoffmenge ($10 - 40 \mu\text{g}$ sgRNA: $7,5 - 30 \mu\text{g}$ Cas9) an RNP-Komplex (RNP: Ribonukleoprotein) zwischen $1,1 \cdot 10^{-8}$ und $3 \cdot 10^{-5}$ (Tabelle 1 der Publikation). Damit liegen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Selektionsfrequenzen zum Teil im Bereich, zum Teil deutlich (zwei Potenzen) über den von Shin et al. ermittelten Werten. Interessant ist die große Spannweite der gelisteten Selektionsfrequenzen [Shin et al., 2016]. Die Autoren vermuten eine große Abhängigkeit der Selektionsfrequenz (und, wie an späterer Stelle diskutiert der Targeteffizienz) vom gewählten Locus. Neben der Abhängigkeit vom Locus, spielt möglicherweise auch die Wahl des Transformationsgerätes eine Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gerät NEPA21 genutzt, ein Gerät, welches komplexe Wellenformen für den *poring* und den *transfer pulse* generieren kann. Zwar konnte für Zellwand-defiziente Stämme kein Unterschied in der Wahl des Gerätes gefunden werden [Park et al., 2020], für Zellwand-intakte Zellen sind die unterschiedlichen Elektroporationswellenformen aber von Bedeutung [Wang et al., 2019]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Stamm CC-125 gearbeitet, welcher über eine intakte Zellwand verfügt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kontrollansätze durchgeführt, bei denen der RNP-Komplex fehlte. Dies entspricht einem Ansatz der klassischen Transformation, ohne dass eine Nuklease verwendet wird und ohne die Targetierung eines bestimmten Locus. Es wurden in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede in der Selektionsfrequenz festgestellt, unabhängig davon ob ohne oder mit RNP-Komplex transformiert wurde. Dieser Versuch zeigt den Effekt der klassischen ungerichteten Insertion, mit dem z.B. Lauersen et al. erfolgreich heterologe Produkte (Terpenoide) in der Mikroalge *C. reinhardtii* produzieren konnte [Lauersen et al., 2016]. Es liegt die Vermutung nahe, dass auch in den Transformationsansätzen mit

RNP einige ungerichtete Insertionen passiert sind. Der hohe Anteil an grünen Kolonien im Vergleich zu CRISPR-Klonen bestätigt diese Vermutung (siehe Abbildung 3.2-1 im Ergebnisteil zur Selektionsfrequenz). Erstaunlicherweise wurden in der Literatur vergleichbare Kontrollversuche nicht gefunden.

Die Selektionseffizienz beschreibt, im Gegensatz zur Selektionsfrequenz, die Anzahl der Zielkolonien im Verhältnis zu den Zellen, die ohne Selektionsmarker wuchsen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Selektionseffizienzen nach dem Vorbild der Arbeit von Ferenczi et al. berechnet. Dieser hatte bei *knock out* Studien eine Selektionseffizienz von 0,02 % ermittelt ([Ferenczi et al., 2017], Publikation Abbildung S1). Dabei wurde ein einzelsträngiger Reparatur-Donor von 118 nt genutzt. In der vorgelegten Arbeit wurden Selektionseffizienzen von 0,0046 % (Transformationsansatz #4, Donor: linearisiert, doppelsträngig, nicht *codon usage* optimiert, ohne homologe Bereiche) bis 0,024 % (Transformationsansatz #1, Donor: Plasmid, *codon usage* optimiert, ohne homologe Bereiche) erzielt (Tabelle 3.3-1 Seite 66). Die Selektionseffizienz des Transformationsansatzes #1 ist dabei mit den Werten aus der Literatur vergleichbar. Bei der Beurteilung der Vergleichbarkeit sollte allerdings beachtet werden, dass bei den publizierten Versuchen sehr viel kürzere Donore genutzt wurden. Bei der Verwendung der *codon usage* optimierten plasmidären Donor Sequenz dAK_10 (Transformationsansatz #1) wurde eine doppelt so hohe Selektionseffizienz erhalten als im Ansatz mit der nicht *codon usage* optimierten plasmidären Variante. Daraus folgt der Schluss, dass es grundsätzlich sinnvoll ist, die Optimierung der Sequenzen im Vorfeld vorzunehmen. Erstaunlicher Weise wurde bisher in der Literatur der Einfluss der Insertlänge, die *codon usage* oder die Form des Donors auf das Intergrationsergebnis in *C. reinhardtii* nicht erforscht. Deshalb war diese Fragestellung Teil der vorliegenden Arbeit.

Da eine Vergleichbarkeit der in der vorliegenden Arbeit bestimmten Selektionsfrequenzen & -effizienzen mit den in der Literatur publizierten Werte vorliegt, konnte von einer gelungenen Etablierung der Transformationsmethode ausgegangen werden.

4.1.2 Targeteffizienz & Reparatur-Modus-Effizienz

Mit Hilfe der *guiding* RNA (gRNA) wird ein bestimmter Lokus targetiert und, durch die Bindung der gRNA mit der Cas-Nuklease, ein Doppelstrangbruch eben dort initiiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es unter anderem, zunächst Transformationsbedingungen zu finden, die eine möglichst hohe Zahl an Transformanten liefert, welche eine Mutation im targetierten Lokus (SNRK2.2, siehe Einleitung Kapitel 1.1.5) tragen. In die Berechnung der Targeteffizienz

gingen die Klone ein, welche mittels des Farbttests als CRISPR-Klone identifiziert wurden; deren Anzahl wurde durch die Anzahl an Kolonien geteilt, die auf Selektionsmedium wuchsen. Die Insertion an eben diesem Ort wird durch die Reparatur-Modus-Effizienz im späteren Teil der Arbeit diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Targeteffizienzen von 0,48 % (DNA-Reparatur-Donor: dAK_13, linearisierte DNA), 1,11 % (Donor: dAK_11, Plasmid, nicht *codon usage* optimiert) und 2,58 % (Donor: dAK_10, Plasmid, *codon usage* optimiert) erreicht. Die Spanne von 0,48 – 2,58 % zeigt, dass die Targeteffizienz abhängig vom eingesetzten Donor ist und mit einem Plasmid, dessen Sequenz *codon usage* optimiert ist, der höchste Wert erreicht werden konnte.

In Tabelle 1.1.4.4-1 Seite 16 der Einleitung ist eine Übersicht einer Auswahl an Anwendungen des CRISPR/Cas-Systems gezeigt, die Arbeiten an der Mikroalge *C. reinhardtii* sowie in humanen und murinen Zellsystemen zeigt. Tabelle 4.1.2-1 ergänzt dies um den Wert der Targeteffizienz für jene Versuche, welche mit *C. reinhardtii* durchgeführt wurden. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Targeteffizienzen sind mit den publizierten Daten vergleichbar. In den Loci *CpFTSY* & *CpSRP43* (codiert für Bestandteile des Chloroplast-Signalerkennungspartikels) und *ZEP* (codiert für die Zeaxanthin Epoxidase, Carotinoidbiosynthese) wurden Targeteffizienzen von 0,56 und 0,46 % [Baek et al., 2016] bzw. 0,5 % [Ferenczi et al., 2017] ermittelt. Im Locus, welcher für das Protein CpSRP43 (Bestandteil des Chloroplast-Signalerkennungspartikels) codiert, wurden Werte von 0,37 [Ferenczi et al., 2017] bzw. 1,4 % [Shin et al., 2016] gefunden. Bei *knock out* Studien im *PSY* (codiert für die Phytoensynthase im Carotinbiosyntheseweg) - Locus konnte eine Targeteffizienz von 3,3 % ermittelt werden [Greiner et al., 2017].

Es konnten jedoch auch Targeteffizienzen von 13 % (*PTH7*-Lokus, codiert für einem putativen Phosphat-Transporter), 22 % (*FKB12*-Lokus, vermittelt die Interaktion zwischen Rapamycin und einem Zellzyklus-Regulator) [Ferenczi et al., 2017] und bis zu 40 % (*MAA7*-Lokus, codiert für die β -Untereinheit der Tryptophan-Synthase) [Shin et al., 2016] im Kerngenom von *C. reinhardtii* ermittelt werden. Diese Werte zeigen erneut, wie stark die Targeteffizienz vom gewählten Locus abhängt. Diese Beobachtungen wurden von den Autoren der Arbeiten nicht erklärt.

Tabelle 4.1.2-1: Übersicht der in *C. reinhardtii* ermittelten Targeteffizienzen aus der Literatur und der vorliegenden Arbeit; mehr Details zu den Versuchen aus der Literatur sind in Tabelle 1.1.4.4-1 Seite 16 aufgeführt.

| Referenz | Ziel des Versuches | DNA-Reparatur-Donor | Lokus | Targeteffizienz |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| [Baek et al., 2016] | <i>knock out</i> , indels | - | <i>CpFTSY</i> | 0,56 % |
| | | | <i>ZEP</i> | 0,46 % |
| [Shin et al., 2016] | <i>knock out</i> (Mutation des RPDAN-Motivs) mit anschließendem Komplementations-Assay | Linearisiertes Plasmid (inkl. Flag-tag) | <i>MAA7</i> | 40 % |
| | <i>knock out</i> mit Zufallsinsertion von Teilen des Vektors | co-Transformation eines Plasmids (Selektionsmarker) | <i>CpSRP43</i> <i>ChIM</i> | 1,4 % 0,17 % |
| [Ferenczi et al., 2017] | <i>knock out</i> mit Hilfe der Insertion einer kurzen Sequenz | ssDNA (118 nt + homologe Bereiche á 49 & 45 nt lang), kodieren für Stop-Kodone | <i>FKB12</i> | 22 bzw. 18 % |
| | | | <i>CpFTSY</i> | 0,5 % |
| | | | <i>CpSRP43</i> | 0,37 % |
| | | | <i>PHT7</i> | 13 % |
| [Greiner et al., 2017] | <i>knock out</i> mit Zufallsinsertion von Teilen des Vektors | co-Transformation eines Plasmids (Selektionsmarker) | <i>PSY</i> | 3,3 % |
| Vorliegende Arbeit | <i>knock in</i> der Pm ^R -Kassette | dAK_10, Plasmid | SNRK2.2 | 2,58 % |
| | | dAK_11, Plasmid | | 1,11 % |
| | | dAK_13 (1946 bp) | | 0,48 % |

Erklärungen zu den von diesen Loci kodierten Proteinen (Kern-kodiert): CpFTSY & CpSRP43: Bestandteile des Chloroplast-Signalerkennungspartikels, beteiligt bei der Assemblierung der Lichtsammelkomplexe; ZEP: Zeaxanthin Epoxidase, Carotinoidbiosynthese, beteiligt an der Anpassungsfähigkeit der Zelle an hoch- und niedrig-UV-Bedingungen; MAA7: β -Untereinheit der Tryptophan-Synthase; ChIM: Mg-Protoporphyrin IX S-Adenosyl-Methionine-O-Methyl-Transferase; FKB12: *FK506-binding protein 12*, vermittelt die Interaktion zwischen Rapamycin und dem Zellzyklus-Regulator; PHT7: putativer Phosphat-Transporter; PSY: Phytoensynthese, Enzym des Carotinbiosynthesewegs; SNRK2.2: Negativregulator der Arylsulfatase

Die Übersicht in Tabelle 4.1.2-1 beschränkt sich auf Arbeiten mit der Mikroalge *C. reinhardtii*. Effizienzen, die in der Arbeit mit Mauszygoten gewonnen wurden, sind methodisch nicht vergleichbar. Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle aber erwähnt, dass mit dem in der Einleitung (Tabelle 1.1.4.4-1) vorgestellten Easi-System 8,5 – 100 % targetierte Jungtiere zur Welt kamen [Quadros et al., 2017]; an anderer Stelle wurde eine Rate von 70 % korrekt targetierter Loci publiziert [Wang et al., 2015]. In humanen Zelllinien gelang eine *in vivo* GFP-Fusion durchzuführen, wobei eine Spezifität von 20 – 95 % erreicht werden konnte [Li et al., 2017]. Dies zeigt, dass die gewonnenen Erkenntnisse zu den Reparaturmechanismen in murinen und humanen Zellsystemen auf das der Pflanzen nicht zu übertragen ist. Die Aufklärung der Reparatur eines Doppelstrangbruchs wurde, wie in der Einleitung Kapitel 1.1.3 beschrieben, an tierischen Zellen durchgeführt. Zwar ist eine Vielzahl an konservierten Bereichen jener Proteine, die an der Reparatur eines Doppelstrangbruchs beteiligt sind im Reich der Bakterien, Archaeen und Eukaryoten konserviert [Aravind et al., 1999], die

Feinregulierung der Rekrutierung der entsprechenden Proteine ist in Pflanzen, *C. reinhardtii* im Besonderen, nicht studiert worden und bedarf weiterer Mechanismusaufklärung.

Viele Studien mit murinen und humanen Stammzellen [Yang et al., 2014; Wang et al., 2015; Li et al., 2017; Quadros et al., 2017; Tasan et al., 2018 & Yu et al., 2020; siehe Tabelle 1.1.4.4-1 Seite 16, Einleitung] zum *gene editing* mittels CRISPR/Cas konzentrieren sich auf den Reparaturmechanismus der homologen Rekombination (HR). Eine spezifische Sequenz, die als HR-Reparaturdonor bereitgestellt wird, kommt dabei zum Einsatz. Da es bei diesem Reparaturmechanismus nicht zu Indels kommen kann und eine Insertion entsprechend präzise ist, wurde in der vorliegenden Arbeit unter anderen auch dieser Ansatz verfolgt. Es zeigte sich jedoch, dass bei den Transformationsansätzen, in denen mit Donoren mit homologen Bereichen gearbeitet wurde (Transformationsansatz #6 - #11), keine CRISPR-Klone erzielt werden konnten. Die in der vorliegenden Arbeit generierten CRISPR-Klone wurden also nicht über den Reparaturmechanismus der HR gewonnen. Dies war so nicht erwartet worden, zumal eine Homogenisierung und Synchronisation der zu transformierenden Kultur am Übergang der Zellzyklusphase G1/S durchgeführt wurde. Es ist publiziert, dass in der S und G2-Phase des Zellzyklus der Reparaturmechanismus der HR stattfindet [Iyama & Wilson III, 2013], woraus folgt, dass in der Phase G1/S sowohl der NHEJ (*non homologous end joining*) als auch der HR stattfinden kann. Zwar ist eine niedrige Effizienz der HR-Mechanismen in Pflanzen bekannt, aber nicht ausgeschlossen. Für höhere Pflanzen wurden Werte von 5,3 bis 8,3 % im *DME*-Lokus (codiert für die Glycosylase Demeter) publiziert [Miki et al., 2018]; für die Mikroalge *C. reinhardtii* wurde 1 HR-Ereignis zu 10^4 ermittelt [Zorin et al., 2009].

Welche anderen Reparaturwege in Frage kommen, soll im Folgenden diskutiert werden. Zunächst werden dabei die Ereignisse an der Schnittstelle des Doppelstrangbruches (DSB) diskutiert.

Reparatur-Modus-Effizienz

Da es in der vorliegenden Arbeit nicht nur um die Präzision des Einfügens eines Doppelstrangbruches (DSB) an einer targetierten Stelle im Genom ging, sondern vor allem auch die Insertion einer funktionalen Kasette zur Produktion eines Enzyms erzielt werden sollte, wurden die Reparatur-Ereignisse an der DBS-Stelle untersucht. Die Ergebnisse der Sequenzierungen im *SNRK2.2*-Lokus der CRISPR-Klone (Übersicht siehe Tabelle 3.5.3-1 Seite 97) zeigte, dass es ganz unterschiedliche Ergebnisse einer Reparatur geben kann. Zur Quantifizierung wurde der Begriff der Reparatur-Modus-Effizienz eingeführt, zu dessen Berechnung jene CRISPR-Klone eingingen, die sowohl am targetierten Lokus (*SNRK2.2*) eine Mutation tragen, als auch eine vollständige Insertion der zu inserierende Kasette.

Die Reparaturmechanismen wurden in tierischen Zellen aufgeklärt (siehe Einleitung Kapitel 1.1.3). Es wird angenommen, dass in pflanzlichen Zellen die Reparatur vergleichbar abläuft. Gestützt wird diese Annahme durch die Vielzahl an konservierten Proteinen in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten [Aravind et al., 1999]. Aus diesem Grund stützt sich die Diskussion der in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse auf die Erkenntnisse der Mechanismen in tierischen Zellen.

In der Literatur wurden für den *end joining* Reparaturmechanismus verschiedene Szenarien beschrieben. Je nach der Beschaffenheit der DSB-Stelle (Polaritäten der Überhänge und – Längen oder chemische Modifikationen der Nachbarnukleotide) und der Zellzyklusphase [Trenner und Sartori, 2019a] kann die Reparatur ohne oder mit Mutationen passieren. Davon abhängig werden unterschiedliche Enzymkomplexe, Nukleasen und Polymerasen synthetisiert. Sie erzeugen *blunt ends*, 3' *single strand*-DNA und/oder andere DSB-Endstrukturen. Diese haben einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis der Reparatur. Die primäre Struktur der durch Cas9 verursachten DSB sind *blunt ends* [Garneau et al., 2010], die keine Endverarbeitung erfordern, um eine Ligation zu ermöglichen. Mehrere Studien in Säugetierzellen haben gezeigt, dass "no indel EJ" (Indel: siehe Einleitung Kapitel 1.1.3) häufig vorkommt [[Bhargava, 2016; Eki et al., 2020], was darauf hindeutet, dass die präzise Reparatur ein robustes Reparaturergebnis ist. Warum der Reparaturmechanismus des *end joinings* dann oft als „error prone“ [Chiruvella et al., 2013] bezeichnet wird, ist darauf zurückzuführen, dass Fehler nicht ausgeschlossen werden können. Es spielt die Genauigkeit der Cas9, genauer gesagt die RuvC-Domäne, eine Rolle. Das Einfügen des DSB 3, 4 [Zuo & Liu, 2016] oder 5 [Shi et al., 2019] Basenpaare *upstream* des PAMs (*protospacer adjacent motif*) wurde beschrieben, was zu „scarless“ bzw. zu einer Verkürzung von ein bis zwei Nukleotiden an der DSB-Stelle führt. Solche Ereignisse wurden auch in der vorliegenden Arbeit gefunden und ebenfalls als „scarless“ bezeichnet (siehe Tabelle 3.5.3-1, die 5'- oder 3'- Position des DSB bei den Klonen #1 A1, 2 & 4, #1 B1 & B2, #1 C1, 2 & 3, #2 A1 & A2, #2 B1 & B2 sowie #2 C1). Die bei den Klonen #1 A3 & A5 (- 13 bzw. - 15 nt) sowie 3' #2 C 1 (-11 nt) gefundenen vergleichsweise langen Deletionen können damit nicht erklärt werden, wurden jedoch in einer späteren Publikation beschrieben und können mit den Enzymreaktionen des Nbn (*central resection gene*) - codierten Proteins Nibrin und der Polymerase Theta (siehe a-EJ, Kapitel 1.1.2, Abbildung 1.1.2-1) erklärt werden [Kosicki et al., 2022].

Auch wurden 5'-Überhänge beschrieben [Shi et al., 2019; Zuo und Liu, 2016]. Diese, meist 1 – 2 Nukleotide langen Überhänge werden dann von der Polymerase Theta aufgefüllt, sodass wieder *blunt ends* für die weitere Reparatur über ein EJ möglich ist. Dieser Prozess wird auch als a-EJ (*alternative end joining*) bezeichnet (siehe Einleitung, Abbildung 1.1.3-1). Das Einfügen dieser zusätzlichen Nukleotide stellt den „error“ dar. Insertionen von 1 – 2

Nukleotiden wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet, sehr wohl konnte aber die Insertion von längeren Sequenzfragmenten beobachtet werden, die kein Teil der eigentlichen Donor-Sequenz waren (siehe Tabelle 3.5.3-1, Spalte „Insertion“, graue Schriftfarbe), sondern unbekanntem Ursprungs sind. Beispielsweise wurden bei den Klonen #1 A 1, 2 & 4 5´ 8 Basenpaare unbekannter Herkunft eingefügt. Die Insertion von einigen wenigen Nukleotiden an der DSB-Stelle wurden bereits mehrfach publiziert: beispielsweise 5 – 7 Basenpaare [Greiner et al., 2017] oder auch 3 - 15 Basenpaare [Shin et al., 2016]. Weiterhin wurden in der vorgelegten Arbeit Insertionen von 139 Basenpaaren an der 3´- Position der Klone ,1A 1, 3 & 4 gefunden werden, wobei 81 Basenpaare davon *antisense* mit einem Teil des Vektorrückgrades des Donors übereinstimmen. Außerdem konnten 41 Basenpaare an der 5´-Position des DSBs unbekanntem Ursprungs bei Klon #1 A3 und 5 gefunden werden, 32 Basenpaare bei Klon #2 C1. Weiterhin wurden 4, 6 und 19 Basenpaare bei Klon #1 A3 & 5, 1 B1 sowie Klon #2 A1 gefunden. Die Klone #1 B2, C1, C2, C3 sowie #2 A2, B1 & B2 und #4 A1 & B1 zeigen keine Insertion von Basenpaaren/Sequenzfragmenten unbekannter Herkunft. In der Literatur wurden Indel-Insertionen über 20 Basenpaare nicht beschrieben; mit Ausnahme sogenannter „*large deletions*“ von bis zu 800 Nukleotiden bei Versuchen mit Mausembryonen [Adikusuma et al., 2018]. Beispiele für Insertionen von bis zu 139 Basenpaaren, wobei vermeintlich weitere Teile eine Donors *antisense* zugehörten, konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Weiterhin konnten in der vorgelegten Arbeit die Ereignisse „*scarless*“, Indel-Insertionen und die Insertion von Sequenzfragmenten von bis zu 139 Basenpaaren keinem Muster zugeordnet werden. Es zeigte sich kein Zusammenhang, ob und wann eine Insertion eines Fragmentes unbekanntem Ursprungs passiert. Es scheint, zum jetzigen Stand des Wissens, ein zufälliger Prozess zu sein. Jedoch gibt es Berichte über die Beteiligung der Polymerase Kappa, TdT und andere (Y-Familie der TLS-Polymerasen), die möglicherweise in der Lage sind freie Sequenzfragmente zusammenzufügen und für eine Reparatur zu sorgen [Cisneros-Aguirre et al., 2022].

Nachdem die Reparaturereignisse direkt an der Schnittstelle des DSB diskutiert wurden, soll nun das Augenmerk auf die Ereignisse der Insertion der Pm^R-Kassette gelegt werden. Erfolgte die Insertion vollständig? Wurden weitere Teile des Donors inseriert? Welche Länge der Insertion war maximal möglich? Dies soll Gegenstand des nächsten Abschnitts sein. Diese sind in Kapitel 3.5.2 detailliert gezeigt und in Tabelle 3.5.3-1 in der Spalte „Insertion“ in blau hervorgehoben.

Unvollständige Insertion der Genkassette

Schaut man sich die Sequenzierergebnisse der in dieser Arbeit generierten Transformanten an, fällt auf, dass die Transformanten #1 A1, 2 & 4 sowie #2 A1, A2, B1 und B2 nur eine unvollständige Pm^R-Kassette tragen.

Bei den Transformanten #1 A1, 2 & 4 (siehe Kapitel 3.5.2) fehlt ein großer Teil der Pm^R-Sequenz, lediglich der Doppelpromotor und 129 Basenpaare der eigentlich 822 bp langen Pm^R-Sequenz (ohne Intron) konnten hier bei der Sequenzierung wieder gefunden werden. Die bei der Sequenzierung gefundenen Insertionslängen (siehe Abbildung 3.5.2-3 Seite 86) konnten durch die lokusspezifische PCR (siehe Abbildung 3.5.2-2 Seite 82) bestätigt werden. In einem Vorexperiment konnte gezeigt werden, dass Zellen, die nicht mit einem Donor transformiert wurden, auf Selektionsmedium nicht wuchsen. Mit Hilfe von Subkultivierungen auf frisch hergestelltem Selektionsmedium konnte ein Problem mit dem Paramomycin-haltigen Agar-Platten ausgeschlossen werden. Es stellte sich also die Frage, in wie weit die gefundenen 129 Basenpaare eine Resistenz vermitteln könnten. Die Struktur des von der Pm^R codierte Enzym AphVIII (Aminoglycosid-3-phosphotransferase VIII) wurde mittels Kristallographie aufgeklärt [Boyko et al., 2016] (BRENDA-Eintrag: EC 2.7.1.B26, PDB: 4H05, Auflösung: 2,15 Å). Dabei wurde die für die Phosphotransferase Aph typische Faltung in zwei Domänen entdeckt: die kleine N-terminale Domäne (AS 1 – 87; Nummerierung hier und im Folgenden nach [Boyko et al., 2016]) und die große C-terminale Domäne (AS 103 – 267), verbunden über einen Linker (AS 88 – 102). Teil des N-Terminus, aufgrund seiner Struktur auch als „*N-terminal lobe*“ bezeichnet [Boyko et al., 2016], ist der *NPL loop (nucleotide-positioning loop)*. Es handelt sich dabei um eine Struktur, die von den Aminosäuren Glycin, Alanin und Serin gebildet wird. Diese Region bildet bekanntermaßen eine Schleife über den Phosphatanteilen des Nukleotidsubstrats und im Fall von AphVIII enthält sie das Motiv G-X-X-G-X [Fong und Berghuis, 2002], das homolog zur G-X-G-X-X-G Konsensus-Sequenz [Thompson et al., 2002] von Proteinkinasen ist. Diese Schleife enthält ein hoch konserviertes Serin, das eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phosphatanteil des Substrats in bekannten Aphs bildet [Thompson et al., 2002]. Die Sequenz für den N-Terminus ist in den Klonen #1 A1, 2 & 4 vorhanden. Die zweite Domäne des Enzyms ist der C-terminale Teil. Aminosäure 145 – 160 formen den *activation loop* (Aktivierungsschleife) [Boyko et al., 2016], wobei wiederum ein Serin-Rest (Ser146) eine zentrale Rolle spielt. Ein Vergleich der Konformationen der Aktivierungsschleife in den Strukturen von AphVIII und anderen bekannten Aphs zeigt eine erhebliche Variabilität ihrer Position. Die Aktivierungsschleife ist ein charakteristisches Merkmal der eukaryotischen Proteinkinasen (ePKs) und die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten in der Schleife überführt diese Enzyme in den aktiven Zustand [Scheeff und Bourne, 2005]. Die

Substrat-Bindetasche wird von den Resten F40, K42, T86, E87, A88, V89, L191, I203 & D204 gebildet [Boyko et al., 2016], Bindestellen für den Co-Faktor Mg²⁺ befindet sich bei AS 189 & 204 (siehe UniProt-Eintrag A0A7K2R4D9, [Chevrette et al., 2019]). Ohne die Aktivierungsschleife und ohne die Substratbindetasche ist eine Funktionalität des Enzyms nicht möglich. Nichtsdestotrotz wurden die Klone #1 A1, 2 & 4 als CRISPR-Klone identifiziert: sie wuchsen auf Selektionsmedium und zeigten im Farbttest (siehe Material- und Methodenteil Kapitel 2.2.8) die für eine am *SNRK2.2*-Lokus befindliche Mutation typische Blaufärbung. Denkbar wäre eine Insertion der Pm^R-Sequenz an andere Stelle im Genom, als Mehrfachinsertion oder sog. „*Off target*“. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, müssen an dieser Stelle die Ergebnisse des Southern Blots (siehe Kapitel 3.6, Abbildung 3.6-1 B) aufgegriffen werden. Eine Mehrfachinsertion konnte bei Klonen, die mit *codon usage* optimierten Donor behandelt wurden, scheinbar ausgeschlossen werden. Allerdings muss man hier die Sonde 1 genauer betrachten (Abbildung 3.6-1 A). Diese bindet, aufgrund von Restriktionsstellen in der Pm^R-Sequenz, im Bereich des Doppelpromotors und dem Anfang der Pm^R-Sequenz. Die in den Klonen #1 A1, 2 & 4 gefundene Insertion ist also abgedeckt und konnte im Southern Blot bestätigt werden. Die Vollständigkeit der Kassette wurde damit jedoch nicht abgedeckt. So wie es für die Klone des Transformationsansatz #2 & #4 gezeigt wurde (siehe Abbildung 3.6-2 B, Ergebnisteil Kapitel 3.6), sind ungerichtete Insertionen nicht auszuschließen, auch nicht von Teilen der Insertionskassette. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der C-terminale Teil der Phosphotransferase gebildet werden kann. Jedoch nicht aufgrund der Insertion im *SNRK2.2*-Lokus, sondern des durch Sonde 1 nicht detektierbaren Teils der Pm^R-Sequenz an anderer unbekannter Stelle im Genom, *in frame* hinter einer wildtypischen Promotorregion.

Bei den Klonen #1 A1, 2 & 4 kam außerdem zu einer weiteren Insertion: ein Fragment von 139 Basenpaaren wurde hier zusätzlich identifiziert (Abbildung 3.5.2-3 B Seite 86). Dieser Sequenzabschnitt konnte zunächst nicht dem Donor zugeordnet werden und wurde deshalb einem separaten *alignment* unterzogen. Dabei konnten 81 bp dieser 139 bp-langen Sequenz *antisense* im Vektorrückgrat des Donors identifiziert werden. Dieses Ergebnis ist durchaus unerwartet, da die Sequenz zum einen in der entgegengesetzten Orientierung eingebaut wurde und zum anderen nicht im direkten Anschluss zu Pm^R-Sequenz liegt, sondern 5' des Terminators. Zelleigene Nukleasen scheinen hier für eine unerwartete Reparatur gesorgt zu haben. Ein solches Phänom wurde in der Literatur bisher für *C. reinhardtii* nicht beschrieben, allerdings zeigten Versuche an transgenen *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen, dass Teile des Vektorrückgrats bei einer mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation in höheren Pflanzen übertragen werden können [De Buck et al., 2000; Shou et al., 2004]. Es wird darin nicht beschrieben, in welcher Orientierung die Fragmente des Rückgrades

eingehen, allerdings zeigte, dass die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation nicht so präzise war, wie bisher angenommen wurde. Möglicherweise trifft dies auch auf Transformationsansätze zu, in denen die Cas9 mit Plasmiden als Donore für die Reparatur eingesetzt werden.

Aus dem Transformationsansatz #2 (Donor: Plasmid, nicht *codon usage* optimiert, keine homologen Bereiche) zeigte der Klon #2 A 1 (Abbildung 3.5.2-7 Seite 92) eine Besonderheit: auch hier inserierte die Pm^R-Kassette nicht vollständig. Im Gegensatz zu den oben beschriebene Klone #1 A1, 2 & 4 ist hier die Pm^R-Sequenz vollständig, es fehlt allerdings die Promoter-Region. Außerdem fand hier eine *antisense*-Insertion statt. Das Wachstum auf Selektionsmedium setzt ein funktionales Enzym voraus. Um die Produktion des Enzyms trotz des Fehlens der Promotorregion zu erklären, könnte man annehmen, dass der Promotor des *SNRK2.2*-Lokus (Orientierung ebenfalls *antisense*, 218 Basenpaare vom Start-ATG der Pm^R-Sequenz entfernt) den Start für die Translation initiiert. Schaut man sich jedoch an, dass neben der vom Donor stammenden Sequenz weitere 19 Nukleotide unbekannter Herkunft als Indel inseriert wurden, erkennt man einen *frameshift*, der diese Annahme in Frage stellt. Möglicherweise sorgen sog. Transkriptionssequenzen im Bereich vor dem Start-ATG der Pm^R-Sequenz für die Produktion, wobei sogenannte TFIIB/D *recognition elements* 35 bzw. 25 Basenpaare vor der Start-Codon nicht gefunden werden konnten. Die Ergebnisse des Southern Blots (siehe Kapitel 3.6) betrachtend, würde die Resistenz bei diesem Klon wahrscheinlich nicht durch die Insertion am *SNRK2.2*-Lokus vermittelt, sondern durch eine Insertion der Kassette an anderer Stelle (*random* Insertionen an ungewollter Stelle; entweder als klassische Insertion oder durch die Ungenauigkeit des RNP-Komplexes, sog. *Off-targets*).

Eine weitere Besonderheit zeigte sich bei den Klone #2 A2, #2B1 & B2 sowie #2 C1, welche ebenfalls aus dem Transformationsansatz #2 (Donor: Plasmid, nicht *codon usage* optimiert, keine homologen Bereiche) stammen. Die Insertion des CRISPR-Klone #2 A2, #2B1 & B2 sowie #2 C1 erfolgte *antisense* (Abbildung 3.5.2-8 & 9 Seite 93f), der Doppelpromotor ist hier nur teilweise inseriert worden, wobei der P_Rbcs2 vollständig vorliegt. Interessanter Weise wurde in beiden Fällen die Promotorregion P_Hsp70A exakt an derselben Stelle verkürzt und inseriert, eine SetI-Restriktionsstelle befindet sich dort. Da der Promotor der kleinen Untereinheit der RuBisCO (P_Rbcs2) vollständig vorliegt, ist die Produktion des Resistenzvermittelnden Enzyms AphVIII (Aminoglycosid-3-phosphotransferase) gegeben [Stevens et al., 1996]. Die Verknüpfung der Promotorregion P_Rbcs2 mit der des Hitzeschockproteins Hsp70A (P_Hsp70A) ist historisch gewachsen und sorgt für eine Verstärkung des Expressionssystems [Schroda et al., 2000]. In der vorliegenden Arbeit jedoch wurde lediglich auf das Wachstum auf Selektionsmedium getestet, nicht auf die produzierte Menge an AphVIII. Dafür war der P_Rbcs2 ausreichend.

Quintessenz

Trotz dessen, dass die Targeteffizienz bei der Verwendung von Plasmiden als DNA-Donor 5fach bzw. 2,3fach höher ist, ist die Verwendung linearisierter doppelsträngiger DNA für eine zielgenaue Insertion von Genkassetten zu empfehlen. Tabelle 3.5.3-1 Seite 97 zeigt, in welcher Art und Weise die Ziel-DNA im *SNRK2.2*-Lokus inserierte, Tabelle 3.5.3-2 zeigt die um die Reparatur-Modus-Effizienz erweiterte Wertetabelle. Einige Insertionen weisen eine unvollständige Insertion der Pm^R-Kassette auf, z.T. wurden Teile des Vektorrückgrades wiedergefunden. Mit einer Reparatur-Modus-Effizienz von 0,48 % konnte mit der linearisierten Genkassette der höchste Wert unter den verschiedenen Transformationsansätzen erzielt werden.

4.2 CRISPR/Cas als *knock in* Methode

In der Literatur sind z.T. sehr hohe Effizienzen der CRISPR/Cas-Maschinerie als *knock in* Methode für Genkassetten beschrieben. Doch selbst im murinen System (embryonale Stammzellen) wurden bis 2015 HR-vermittelte Insertionen als ineffizient beschrieben [Wang et al., 2015]. Später wurden unter der Verwendung einzelsträngiger DNA-Reparatur-Donoren mit homologen Bereichen im Maus-System sowohl *floxed sites* als auch Genkassetten, welche für Reporter oder Transaktivatoren kodieren, eingefügt. Als Easi (Efficient additions with ssDNA inserts)-CRISPR [Quadros et al., 2017] oder CRISPR-READI (RNP electroporation and AAV donor infection) [Chen et al., 2019] bezeichnet, konnten HR-Effizienzen von 25 – 67 % für die Insertion von Genkassetten mit dem Easi-System und 10 – 20 % bzw. 40 – 75 % für eine biallelische bzw. partielle HR-Rate mit dem READI-System erreicht werden.

Die erreichten Effizienzen sind nur sehr begrenzt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Der Reparaturmechanismus über die homologe Rekombination ist im Maussystem weit weniger selten als in *C. reinhardtii* ([Zorin et al., 2009]: 1 HR-Ereignis zu 10⁴). Die Länge der einzelsträngigen DNA-Reparatur-Donore betrug dabei durchschnittlich 600-1500 bp inkl. der flankierenden homologen Bereiche (je 55 – 100 bp bzw. 480 bp). In höheren Pflanzen wurden Unterschiede der Effizienz des *gene targetings* in den verschiedenen Entwicklungsstadien einer Pflanze gefunden. Es wurde diskutiert, dass der Reparaturmechanismus der HR in Eizellen und im frühen embryonalen Stadium von *Arabidopsis thaliana* effizienter funktioniert als in Keimbahngewebe, wie z.B. Pollen und dem Sprossapikalmeristem. Es konnte eine Effizienz des *gene targetings* von 5,3 bis 8,3 % im DME-Lokus (codiert für die Glycosylase Demeter) gefunden werden [Miki et al., 2018].

B. Wang nutzte doppelsträngige linearisierte Donore [Wang et al., 2015]. Das Insert hatte dabei eine Länge von 7,4 kb, zusätzlich dazu wurden homologe Arme codiert, sodass die DNA-

Reparatur-Donore knapp 20 kb Länge zusammenbrachten. Eine Effizienz von 32 % konnte erreicht werden. Auch dies ist nur bedingt vergleichbar, da es im Maussystem gefunden wurde, sollte hier aber der Vollständigkeit halber mit aufgeführt sein. Die in *C. reinhardtii* postulierte Lokus-Abhängigkeit der Targeteffizienz [Shin et al., 2016] wurde so in humanen und murinen Systemen nicht diskutiert.

Einige Arbeitsgruppen nutzen für ihre Versuche neben den eigentlichen DNA-Reparatur-Donoren Plasmide, welche eine Resistenz vermitteln. Es wurde publiziert, dass eben solche Plasmide vorrangig an der Stelle des DSB integrieren, diese wurde mit NHEJ-Reparaturmechanismus in Verbindung gebracht [Shin et al., 2016]. Dies konnte ich in meiner Arbeit, in welcher die Resistenzkassette an sich der Donor war, bestätigen. Teile des Plasmides in Transformationsansatz #1 & 2 sind ganz ohne homologe Arme im *SNRK2.2*-Lokus inseriert.

In den Studien von A. Greiner wurde nicht nur das Cas-System untersucht, sondern auch Zinkfinger Nukleasen (ZFN) [Greiner et al., 2017]. Es wurde die Aussage getroffen, dass ein DSB, welcher mit der Cas9 erzeugt wird, ca. 10fach weniger häufig durch den HR-Reparaturmechanismus repariert wird als jene, die durch die ZFN verursacht werden. Als Idee wird angeführt, dass die Cas9 *blunt end cuts* verursacht, länger auf der DNA verweilt und verzögert von der geschnittenen DNA freigesetzt wird [Sternberg et al., 2014]. All das könnte die Integration symmetrischer DNA-Reparatur-Donore behindern und eine Integration über den NHEJ-Weg bevorzugen. Neben der Verwendung von NHEJ-Inhibitoren (siehe Kapitel 6 Ausblick) wird die Anwendung von einzelsträngigen Donoren vorgeschlagen, welche PTO- (Phosphothioat-Oligonukleotid) geschützt sind. Diese erhöhen die Halbwertszeit der Donore in der Zelle und erhöhen ggf. die Wahrscheinlichkeit einer Reparatur über den HR-Mechanismus. Zum Zeitpunkt der Versuche mit den einzelsträngigen DNA-Reparatur-Donoren in der vorliegenden Arbeit war es technisch nicht möglich, die Termini der Stränge entsprechend zu schützen. Für kurze einzelsträngige Fragmente hätte man es erwerben können, für Fragmentgrößen von 1941 Nukleotiden und größer war dies nicht möglich.

In der öffentlichen Diskussion über die Möglichkeiten, welche sich mit der Nutzung der CRISPR/Cas-Maschinerie eröffnet haben, fällt der Begriff der sog. *Off-target* Effekte. Das Phänomen des *Off-target* Effekts ist von den klassischen Insertionen zu trennen. Klassische Insertionsmethoden beruhen auf einer ungerichteten Insertion, dabei gibt es keinen targetierten Lokus. Mit einem *Off-target* Effekt ist im Gegensatz dazu das Phänomen gemeint, welches auf einer Ungenauigkeit des RNP-Komplexes beruht, eine Ungenauigkeit der Bindung der *guiding* RNA an eine Sequenz, welche der Target-Lokus-Sequenz ähnelt, dieser aber nicht entspricht. *Off-target* Effekte können entstehen, wenn z.B. zusätzliche partielle Homologien

der eigentlichen *target*-Sequenz zu anderen Stellen im Genom existieren. Sie lassen sich durch die Auswahl geeigneter *target*-Sequenzen reduzieren. Um *Off-target* Mutationen zu vermeiden wurde beim Design das *online tool* CRISPR-P 2.0 (Link siehe Literaturverzeichnis) genutzt. Das in der vorgelegten Arbeit genutzte *screening* System mittels des Wachstums auf Selektionsmedium und des Farbtests kann zwischen diesen beiden Fällen nicht unterscheiden. Die Versuche, welche mit und ohne RNP-Komplex durchgeführt wurden (siehe Abbildung 3.2-2 des Ergebnisteils) lassen jedoch vermuten, dass der Anteil an „klassischer Insertion“ hoch ist.

Um die in der vorliegenden Arbeit generierten CRISPR-Klone auf eben diese Effekte zu untersuchen, wurde eine Southern Blot-Analyse (Abbildung 3.6-1 & 2 Seite 102ff) durchgeführt. Damit sollte analysiert werden, ob es trotz des entsprechenden Designs der gDNA weitere Insertionsorte gibt. Für die CRISPR-Klone des Transformationsansatzes #1 (plasmidäre DNA als Reparatur-Donor-DNA, *codon usage* optimiert, dAK10) konnten mit dem in der vorgelegten Arbeit genutzten Design der Sonde (Sonde 1, siehe Abbildung 3.6-1) keine weiteren Insertionsorte ermittelt werden. Jedoch zeigte sich bei der Sequenzierung (siehe Abbildung 3.5.2-3), dass die Pm^R-Kassette nur unvollständig inserierte und damit die Bildung eines funktionalen AphVIII (Aminoglycosid-3-phosphotransferase, siehe Kapitel 1.1.6 der Einleitung) nicht möglich ist. Dies lässt darauf schließen, dass der C-terminale Teil, welcher von der Sonde nicht abgedeckt wird, anderswo inserierte und eine enzymatische Reaktion ermöglicht. Eine abschließende Aussage zu Mehrfachinsertionen mit *codon usage* optimierten Donoren ist deshalb nicht möglich.

Weiterhin zeigte die Southern Blot Analyse, dass Mehrfachinsertionen mit nicht *codon usage* optimierten Donor-Sequenzen nicht auszuschließen sind, sondern, im Gegenteil, sogar vielfältig zu sein scheinen. Ein denkbarer Erklärungsansatz für diese Beobachtung wäre, dass die zu inserierende DNA von *C. reinhardtii*-eigenen Nukleasen im Zellkern womöglich fragmentiert wird und die entsprechend kleineren Fragmente ungerichtet in das Genom inseriert werden, *Off-target* Integrationen entstehen. Die Gruppe um Prof. William T. Pu, HSC Boston, diskutiert, dass die Länge der zu inserierenden DNA-Sequenzen eine erhebliche Rolle bei der Effizienz der Insertion spielt [Li et al., 2014]. Zwar wurden dabei embryonale Stammzellen der Maus untersucht, weshalb die absoluten Zahlen für die Effizienz der Insertion (GFP) nicht übertragbar sind. Dennoch bietet die Publikation Erklärungsansätze für die DNA-Reparatur bei Versuchsansätzen mit dem CRISPR/Cas9-System im Allgemeinen. Mit zunehmender Länge nimmt dort die Effizienz der Insertion ab: 99 bp wurden mit einer Effizienz von 36 % inseriert, 720 bp mit einer Effizienz von 4,3 %. Geht man also davon aus, dass auch in *C. reinhardtii* kürzere Fragmente mit einer entsprechend höheren Wahrscheinlichkeit im Genom integrieren, so könnte dies die in Abbildung 3.6-2 B detektierten Signale erklären.

Dieses Ergebnis zeigt, dass neben dem Design der gDNA eine Prüfung auf *Off-targets* unabdingbar ist.

Die vorübergehende Präsenz von RNP-Molekülen wurde in Reis-Pflanzen als Methode beschrieben, welche das Auftreten von *Off-targets* verringern kann [Banakar et al., 2019]

Auch wurde im murinen System das Problem der *Off-targets* als *rare instances* bezeichnet [Yang et al., 2013] . Dies kann in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erweiterung von Methoden zur gezielten Modifikation des Kerngenoms der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) mithilfe der CRISPR/Cas-Technologie. Dazu kamen verschiedene DNA-Reparatur-Donore (Donore) zum Einsatz, mit deren Hilfe eine vollständige, präzise sowie effiziente Insertion eines Zielgens erfolgen kann. Als Genkassette, die inseriert werden sollte, wurde eine Sequenz gewählt, die für das Enzym Aminoglycoside-3'-phosphotransferase aus *Streptomyces rimosus* codiert. Diese vermittelt eine Resistenz gegen Paromomycin, welche eine Selektion ermöglicht. Die Insertion wurde am *SNRK2.2*-Lokus vorgenommen, einer Stelle im Genom, bei dessen *knock out* das Enzym Arylsulfatase unreguliert produziert wird. Die erfolgreiche Insertion an dieser Stelle kann mit einer Farbreaktion des Enzyms mit einem geeigneten Substrat nachgewiesen werden. Die Anzahl der Klone, welche nach der Transformation eine positive Reaktion im Farbttest zeigten, wurde zur Berechnung der Transformationseffizienz verwendet. Diese Klone wurden sequenziert, sodass das Insertionsgeschehen genau studiert werden konnte. Mittels Southern Blot Analyse wurde die Häufigkeit der Insertion untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnten folgende Ergebnisse gefunden werden:

- Insertion von bis zu 3851 bp an der gewünschten Stelle im Genom (zirkuläres Plasmid als Donor) mittels *end joining* Reparatur-Mechanismen
- Bestätigung, dass eine Insertion mittels HR (homologen Rekombination) - unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Bedingungen - nicht erfolgt
- Erreichen der Targeteffizienzen von bis zu 2,58 % (zirkuläres Plasmid als Donor), dieser Wert ist etwa doppelt so hoch wie die Literaturwerte bei vergleichbaren Versuchsbedingungen
- Bei der Nutzung plasmidärer Donore zeigte sich, dass eine Voraussage über Insertionslänge, Orientierung und Vollständigkeit der Zielsequenz nicht möglich ist. Eine Vorhersage über die Insertion von Fragmenten, deren Ursprung nicht Teil des Donors ist, konnte nicht getroffen werden. Es konnten keine „Muster“ gefunden werden, welche einen Aufschluss über die zellinterne Linearisierung der plasmidären Donore liefern könnten
- Erreichen einer präzisen und vollständigen Insertion bei Nutzung eines doppelsträngigen und linearisierten Donors, wobei keine Fragmente unbekannter Herkunft mitinsertierten
- Mittels Southern Blot Analyse wurde gezeigt, dass bei Experimenten ohne Optimierung der *codon usage* der Donor-Sequenz in *C. reinhardtii* Mehrfachinsertionen stattfanden, bei optimierten Donoren konnten mit der genutzten Sonde (Bindung im Bereich des

Doppelpromotors und des Anfangsbereiches der Pm^R-Sequenz) nur Einfachinsertionen gefunden werden. Jedoch legen die Daten der Sequenzierung nahe, dass es auch hier zu Insertionen des C-terminalen Teils anderswo gekommen sein muss.

Gerade weil die Insertion fremder DNA in *C. reinhardtii* mittels HR so unwahrscheinlich ist, macht es die Nutzung der Nuklease Cas so attraktiv. Die Cas9 in Komplex mit der *guiding* RNA findet ihren targetierten Locus im Genom und die im Transformationsansatz angebotene Donor-DNA wird an dieser Stelle eingebaut, die entsprechenden Effizienzen sind in der vorliegenden Arbeit dargestellt. Auch wenn der Einbau selbst nicht über den Mechanismus der HR läuft, ist eine Präzision der Insertion trotzdem durch die Nutzung und Präzision der Cas gegeben.

Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu Folge, ist für die Anwendung der CRISPR/Cas-Technologie in *C. reinhardtii* ein Donor (Länge der für Paromomycin codierenden Sequenz: ca. 2000 bp) bevorzugt doppelsträngig, linear und *codon usage* optimiert zu gestalten.

6 Ausblick

Bei den in der vorliegenden Arbeit erzielten Untersuchungen zum Design der im Transformationsansatz anzubietenden DNA-Reparatur-Donor (Donor) – Design, zeigte sich, dass eine Insertion mit doppelsträngiger linearisierter Donor-DNA an der targetierten Stelle funktioniert. In wie weit die Optimierung der *codon usage* einen Einfluss auf die Einfach- oder Mehrfachinsertion (*Off-target*) hat, ist durch die Wahl einer weiteren Sonde abschließend zu klären. Die Sonde sollte dabei auch den codierenden Bereich für den C-Terminus des Enzyms abdecken. So kann das Wachstum der CRISPR-Klone #1 A1, 2 & 4 weiter untersucht werden. Nichtsdestotrotz ist es für zukünftige Versuche zu empfehlen, den linearisierten Ansatz mit *codon usage* optimierter Sequenz zu testen, um den Effekt auf die Reparatur-Modus-Effizienz zu untersuchen.

Die Versuche zur Nutzung von homologen Bereichen sollten intensiviert werden, da dies die Targeteffizienz womöglich erheblich steigern würde. Der Gruppe um Prof. Hegemann an der Humboldt-Universität in Berlin gelang 2005 die Komplementation der Paromomycin-Resistenzkassette über homologe Rekombination (HR) ohne die Nutzung einer Nuklease in einen entsprechenden Rezipientenstamm durch die Nutzung sehr langer homologer Regionen (1,4 kb), sowohl mit doppelsträngiger als auch einzelsträngiger Donore und schlussfolgert, dass einzelsträngige Donore eine höhere Targeteffizienz haben. Aus diesem Grunde sind weitere Versuche in dieser Richtung denkbar. Dabei sollten nicht nur verschiedene Längen der homologen Bereiche studiert werden, sondern auch ein höherer Einsatz an RNP-Komplex und Donor sollte geprüft werden. Zum Vergleich: die Gruppe um Dr. Molnar in Edinburgh [Ferenczi et al., 2017] nutzte 2017 0,526 nmol Nuklease und 1,578 nmol gRNA für seine *knock out*-Studien; in der oben beschriebenen Publikation aus Berlin 2005 wurden 1 - 70 µg Donor-DNA verwendet. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde auf Grund der Vergleichbarkeit aller Ansätze untereinander 12 pmol RNP und 0,68 pmol Donor verwendet, wobei eine neuere Arbeit der Gruppe um Prof. Hegemann von 2017 als Orientierung genutzt wurde.

Um die von Natur aus geringe HR-Rate in *C. reinhardtii* neben der Tag-Nacht-Synchronisierung der Zellen vor der Transformation weiter anzuheben, wäre auch der Einsatz sog. „*small molecules*“ denkbar. Die Gruppe um Prof. Wu, China, beispielsweise zeigte 2017 in fötalen Fibroblasten vom Schwein, dass der Einsatz von Scr7, L755507 & Resveratrol die HR-Rate um 2-3fach ansteigert. Scr7 & Resveratrol gehören beide zur Gruppe der NHEJ-Inhibitoren und blockieren die Ligase IV-vermittelte Zusammenschließung von DNA-Enden bzw. regulieren die Expression der Ku70/80 herunter. L755507 ist ein wirksamer partieller β 3-adrenerger Rezeptor-Agonist, welcher als HR-Enhancer gehandelt wird. Allerdings ist bei

ähnlichen Versuchsansätzen mit *C. reinhardtii* eine Verringerung der Impedanz des Transformationsansatzes in der Küvette zu vermeiden. Bei Werten unter 0,24 k Ω ist die Vitalität der Zellen nach der Transformation erheblich eingeschränkt, Werten unter 0,16 k Ω sind letal (Daten nicht gezeigt).

Anknüpfend an die Verlängerung der homologen Bereiche bei der Anwendung einzelsträngiger Donore wäre dies nach Vorbild der Arbeiten um die Gruppe von Prof. Wang an der medizinischen Universität in Florida für doppelsträngige Donore denkbar. Dabei kamen asymmetrische homologe Bereiche von über 3 kb bei den Arbeiten im murinen System zum Einsatz. Auch dieser Möglichkeit sollte in anschließenden Versuchen nachgegangen werden. Die Gruppe Prof. Zhao an der Universität in Illinois nutzte 2020 in HEK293T-Zellen erfolgreich 5'-modifizierte doppelsträngige Donore mit kurzen homologen Armen. Auch diese Möglichkeit kann in Betracht gezogen werden und für die Mikroalge untersucht werden.

Wie sich in der vorliegenden Arbeit zeigte und bestätigte, sind Ergebnisse zu Insertionserfolgen aus Zellkultur- oder Tierversuchen nicht auf *C. reinhardtii* einfach übertragbar. Dennoch können und sollten Sie als Anregung für weitere Versuche in Richtung einer gezielten Insertion mittels HR dienen.

7 Literatur

- Adikusuma, F., Piltz, S., Corbett, M. A., Turvey, M., McColl, S. R., Helbig, K. J., Beard, M. R., Hughes, J., Pomerantz, R. T. und Thomas, P. Q. (2018). "Large deletions induced by Cas9 cleavage." *Nature*, **560**, E8-E9.
- Aksoy, M., Pootakham, W., Pollock, S. V., Moseley, J. L., González-Ballester, D. und Grossman, A. R. (2013). "Tiered regulation of sulfur deprivation responses in *Chlamydomonas reinhardtii* and identification of an associated regulatory factor." *Plant physiology*, **162**, 195-211.
- Alami, A. H., Alasad, S., Ali, M. und Alshamsi, M. (2021). "Investigating algae for CO₂ capture and accumulation and simultaneous production of biomass for biodiesel production." *Science of the Total Environment*, **759**, 143529.
- Aravind, L., Walker, D. R. und Koonin, E. V. (1999). "Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems." *Nucleic acids research*, **27**, 1223-1242.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Fukuzawa, H. und Tabata, S. (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 Research*, **6**, 369-373.
- Audebert, M., Salles, B. und Calsou, P. (2004). "Involvement of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-strand Breaks Rejoining*." *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 55117-55126.
- Baek, K., Kim, D. H., Jeong, J., Sim, S. J., Melis, A., Kim, J.-S., Jin, E. und Bae, S. (2016). "DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins." *Scientific Reports*, **6**, 30620.
- Banakar, R., Eggenberger, A. L., Lee, K., Wright, D. A., Murugan, K., Zarecor, S., Lawrence-Dill, C. J., Sashital, D. G. und Wang, K. (2019). "High-frequency random DNA insertions upon co-delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein and selectable marker plasmid in rice." *Scientific Reports*, **9**, 19902.
- Barahimipour, R., Strenkert, D., Neupert, J., Schroda, M., Merchant Sabeeha, S. und Bock, R. (2015). "Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *The Plant Journal*, **84**, 704-717.
- Barbieri, M. R., Larosa, V., Nouet, C., Subrahmanian, N., Remacle, C. und Hamel, P. P. (2011). "A Forward Genetic Screen Identifies Mutants Deficient for Mitochondrial Complex I Assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Genetics*, **188**, 349-358.
- Barrera, D. J., Rosenberg, J. N., Chiu, J. G., Chang, Y.-N., Debatis, M., Ngoi, S.-M., Chang, J. T., Shoemaker, C. B., Oyler, G. A. und Mayfield, S. P. (2015). "Algal chloroplast produced camelid VHH antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin." *Plant Biotechnology Journal*, **13**, 117-124.
- Bennoun, P., Spierer-Herz, M., Erickson, J., Girard-Bascou, J., Pierre, Y., Delosme, M. und Rochaix, J.-D. (1986). "Characterization of photosystem II mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the *psbA* gene." *Plant Molecular Biology*, **6**, 151-160.
- Bertalan, I., Munder, M. C., Weiß, C., Kopf, J., Fischer, D. und Johanningmeier, U. (2015). "A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Journal of Biotechnology*, **195**, 60-66.
- Berthold, P., Tsunoda, S. P., Ernst, O. P., Mages, W., Gradmann, D. und Hegemann, P. (2008). "Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization." *The Plant cell*, **20**, 1665-1677.
- Bhargava, R. (2016). "Regulation of single-strand annealing and its role in genome maintenance." *Trends Genet.*, **32**.
- Bhaya, D., Davison, M. und Barrangou, R. (2011). "CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation." *Annual Review of Genetics*, **45**, 273-297.

- Blaby, I. K., Blaby-Haas, C. E., Tourasse, N., Hom, E. F. Y., Lopez, D., Aksoy, M., Grossman, A., Umen, J., Dutcher, S., Porter, M., King, S., Witman, G. B., Stanke, M., Harris, E. H., Goodstein, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Vallon, O., Merchant, S. S. und Prochnik, S. (2014). "The Chlamydomonas genome project: a decade on." *Trends in Plant Science*, **19**, 672-680.
- Boch, J. (2011). "TALEs of genome targeting." *Nature Biotechnology*, **29**, 135-136.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. und Ehrlich, S. D. (2005). "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin." *Microbiology*, **151**, 2551-2561.
- Boyko, K. M., Gorbacheva, M. A., Korzhenevskiy, D. A., Alekseeva, M. G., Mavletova, D. A., Zakharevich, N. V., Elizarov, S. M., Rudakova, N. N., Danilenko, V. N. und Popov, V. O. (2016). "Structural characterization of the novel aminoglycoside phosphotransferase AphVIII from *Streptomyces rimosus* with enzymatic activity modulated by phosphorylation." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **477**, 595-601.
- Byrne, T. E., Wells, M. R. und Johnson, C. H. (1992). "Circadian rhythms of chemotaxis to ammonium and of methylammonium uptake in *Chlamydomonas*." *Plant physiology*, **98**, 879-886.
- Cerutti, H., Ma, X., Msanne, J. und Repas, T. (2011). "RNA-mediated silencing in Algae: biological roles and tools for analysis of gene function." *Eukaryotic cell*, **10**, 1164-1172.
- Chen, B., Gilbert, Luke A., Cimini, Beth A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.-W., Park, J., Blackburn, Elizabeth H., Weissman, Jonathan S., Qi, Lei S. und Huang, B. (2013). "Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System." *Cell*, **155**, 1479-1491.
- Chen, S., Sun, S., Moonen, D., Lee, C., Lee, A. Y.-F., Schaffer, D. V. und He, L. (2019). "CRISPR-READI: Efficient Generation of Knockin Mice by CRISPR RNP Electroporation and AAV Donor Infection." *Cell Reports*, **27**, 3780-3789.e4.
- Chevrette, M. G., Carlson, C. M., Ortega, H. E., Thomas, C., Ananiev, G. E., Barns, K. J., Book, A. J., Cagnazzo, J., Carlos, C. und Flanigan, W. (2019). "The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes." *Nature communications*, **10**, 516.
- Chiruvella, K. K., Liang, Z. und Wilson, T. E. (2013). "Repair of double-strand breaks by end joining." *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **5**, a012757-a012757.
- Cisneros-Aguirre, M., Ping, X. und Stark, J. M. (2022). "To indel or not to indel: Factors influencing mutagenesis during chromosomal break end joining." *DNA repair*, 103380.
- Clerici, M., Mantiero, D., Guerini, I., Lucchini, G. und Longhese, M. P. (2008). "The Yku70–Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle." *EMBO reports*, **9**, 810-818.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. und Zhang, F. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." *Science (New York, N.Y.)*, **339**, 819-823.
- Consortium, G. P. (2010). "A map of human genome variation from population scale sequencing." *Nature*, **467**, 1061.
- Crayton, M. A. (1982). "A COMPARATIVE CYTOCHEMICAL STUDY OF VOLVOCEAN MATRIX POLYSACCHARIDES1." *Journal of Phycology*, **18**, 336-344.
- Davies, J. P. und Grossman, A. R. (1998). "THE USE OF CHLAMYDOMONAS (CHLOROPHYTA: VOLVOCALES) AS A MODEL ALGAL SYSTEM FOR GENOME STUDIES AND THE ELUCIDATION OF PHOTOSYNTHETIC PROCESSES." *Journal of Phycology*, **34**, 907-917.
- Davies, J. P., Weeks, D. P. und Grossman, A. R. (1992). "Expression of the arylsulfatase gene from the β 2-tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Nucleic acids research*, **20**, 2959-2965.
- Davies, J. P., Yildiz, F. und Grossman, A. (1996). "Sac1, a putative regulator that is critical for survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur deprivation." *The EMBO journal*, **15**, 2150-2159.

- Davies, J. P., Yildiz, F. H. und Grossman, A. R. (1999). "Sac3, an Snf1-like serine/threonine kinase that positively and negatively regulates the responses of *Chlamydomonas* to sulfur limitation." *The Plant Cell*, **11**, 1179-1190.
- De Buck, S., De Wilde, C., Van Montagu, M. und Depicker, A. (2000). "T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation." *Molecular Breeding*, **6**, 459-468.
- de Laat, W. L., Appeldoorn, E., Jaspers, N. G. J. und Hoeijmakers, J. H. J. (1998). "DNA Structural Elements Required for ERCC1-XPF Endonuclease Activity*." *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 7835-7842.
- Demurtas, O. C., Massa, S., Ferrante, P., Venuti, A., Franconi, R. und Giuliano, G. (2013). "A *Chlamydomonas*-Derived Human Papillomavirus 16 E7 Vaccine Induces Specific Tumor Protection." *PLOS ONE*, **8**, e61473.
- Dent, R. M., Haglund, C. M., Chin, B. L., Kobayashi, M. C. und Niyogi, K. K. (2005). "Functional Genomics of Eukaryotic Photosynthesis Using Insertional Mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Physiology*, **137**, 545-556.
- Dent, R. M., Sharifi, M. N., Malnoë, A., Haglund, C., Calderon, R. H., Wakao, S. und Niyogi, K. K. (2015). "Large-scale insertional mutagenesis of *Chlamydomonas* supports phylogenomic functional prediction of photosynthetic genes and analysis of classical acetate-requiring mutants." *The Plant Journal*, **82**, 337-351.
- Deyab, M. A., El-Sadany, A., Ghazal, M. A. und El-Adl, M. (2021). "Nitrogen deficiency maximizes the production and accumulation of β -carotene via induction of different macromolecule derivatives in *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco." *Egyptian Journal of Botany*, **61**, 453-466.
- Difilippantonio, M. J., Zhu, J., Chen, H. T., Meffre, E., Nussenzweig, M. C., Max, E. E., Ried, T. und Nussenzweig, A. (2000). "DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation." *Nature*, **404**, 510-514.
- Eki, R., She, J., Parlak, M., Benamar, M., Du, K.-P., Kumar, P. und Abbas, T. (2020). "A robust CRISPR-Cas9-based fluorescent reporter assay for the detection and quantification of DNA double-strand break repair." *Nucleic Acids Research*, **48**, e126-e126.
- Ermilova, E. V., Chekunova, E. M., Zalutskaya, Z. M., Krupnov, K. R. und Gromov, B. V. (1996). "Isolation and Characterization of Chemotaxis Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Current Microbiology*, **32**, 357-359.
- Ferenczi, A., Pyott, D. E., Xipnitou, A. und Molnar, A. (2017). "Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, 13567-13572.
- Fong, D. H. und Berghuis, A. M. (2002). "Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry." *The EMBO journal*, **21**, 2323-2331.
- Freeman Rosenzweig, E. S., Xu, B., Kuhn Cuellar, L., Martinez-Sanchez, A., Schaffer, M., Strauss, M., Cartwright, H. N., Ronceray, P., Plitzko, J. M., Förster, F., Wingreen, N. S., Engel, B. D., Mackinder, L. C. M. und Jonikas, M. C. (2017). "The Eukaryotic CO₂-Concentrating Organelle Is Liquid-like and Exhibits Dynamic Reorganization." *Cell*, **171**, 148-162.e19.
- Fuhrmann, M., Oertel, W. und Hegemann, P. (1999). "A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*." *The Plant Journal*, **19**, 353-361.
- Garneau, J. E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H. und Moineau, S. (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." *Nature*, **468**, 67-71.
- Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. und Riggs, A. D. (1979). "Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**, 106-110.

- Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X. und Gao, H. (2011). "Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **38**, 1879-1890.
- Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J. und Lopez, B. S. (2012). "Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining." *American journal of cancer research*, **2**, 249-268.
- Greiner, A., Kelterborn, S., Evers, H., Kreimer, G., Sizova, I. und Hegemann, P. (2017). "Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-finger Nucleases and CRISPR/Cas9." *The Plant Cell*.
- Hermans, P. W., van Soolingen, D., Bik, E. M., de Haas, P. E., Dale, J. W. und van Embden, J. D. (1991). "Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains." *Infection and Immunity*, **59**, 2695-2705.
- Huang, K., Diener, D. R., Mitchell, A., Pazour, G. J., Witman, G. B. und Rosenbaum, J. L. (2007). "Function and dynamics of PKD2 in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella." *The Journal of cell biology*, **179**, 501-514.
- Hyams, J. und Davies, D. R. (1972). "INDUCTION AND CHARACTERISATION OF CELL WALL MUTANTS OF CHLAMYDOMONAS REINHARDI."
- Ira, G., Pellicoli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N. M., Haber, J. E. und Foiani, M. (2004). "DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1." *Nature*, **431**, 1011-1017.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. und Nakata, A. (1987). "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product." *Journal of bacteriology*, **169**, 5429-5433.
- Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J. und Haber, J. E. (1996). "Genetic Requirements for the Single-Strand Annealing Pathway of Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics*, **142**, 693-704.
- Iyama, T. und Wilson III, D. M. (2013). "DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells." *DNA repair*, **12**, 620-636.
- Jansen, R., Embden, J. D. A. v., Gaastra, W. und Schouls, L. M. (2002). "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes." *Molecular Microbiology*, **43**, 1565-1575.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna Jennifer, A. und Charpentier, E. (2012). "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." *Science*, **337**, 816-821.
- Kadyk, L. C. und Hartwell, L. H. (1992). "Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics*, **132**, 387-402.
- Kao, P.-H. und Ng, I. S. (2017). "CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Bioresource Technology*, **245**, 1527-1537.
- Kim, Y. G., Cha, J. und Chandrasegaran, S. (1996). "Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 1156-1160.
- Kleinegris, D. M., Janssen, M., Brandenburg, W. A. und Wijffels, R. H. (2011). "Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*." *Enzyme and Microbial Technology*, **48**, 253-259.
- Kosicki, M., Allen, F., Steward, F., Tomberg, K., Pan, Y. und Bradley, A. (2022). "Cas9-induced large deletions and small indels are controlled in a convergent fashion." *Nature communications*, **13**, 3422.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A.,

- Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.-F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature*, **409**, 860-921.
- Lauersen, K. J., Baier, T., Wichmann, J., Wördenweber, R., Mussnug, J. H., Hübner, W., Huser, T. und Kruse, O. (2016). "Efficient phototrophic production of a high-value sesquiterpenoid from the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Metabolic Engineering*, **38**, 331-343.
- Lefebvre, P. A. und Silflow, C. D. (1999). "Chlamydomonas: The Cell and Its Genomes." *Genetics*, **151**, 9.
- Li, H., Beckman, K. A., Pessino, V., Huang, B., Weissman, J. S. und Leonetti, M. D. (2017). "Design and specificity of long ssDNA donors for CRISPR-based knock-in." *bioRxiv*, authors manuscript.
- Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S. und Wang, G. (2011). "An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*." *Biotechnology advances*, **29**, 568-574.
- Li, K., Wang, G., Andersen, T., Zhou, P. und Pu, W. T. (2014). "Optimization of Genome Engineering Approaches with the CRISPR/Cas9 System." *PLOS ONE*, **9**, e105779.
- Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S. S., Blum, S. R., Ivanova, N., Yue, R., Robertson, J. M., Lefebvre, P. A., Fitz-Gibbon, S. T., Grossman, A. R. und Jonikas, M. C. (2016). "An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in *Chlamydomonas reinhardtii*." *The Plant Cell*, **28**, 367-387.
- Liu, Y. und West, S. C. (2004). "Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**, 937-944.
- Lopez, D., Hamaji, T., Kropat, J., De Hoff, P., Morselli, M., Rubbi, L., Fitz-Gibbon, S., Gallaher, S. D., Merchant, S. S., Umen, J. und Pellegrini, M. (2015). "Dynamic Changes in the Transcriptome and Methylome of *Chlamydomonas reinhardtii* throughout Its Life Cycle." *Plant Physiology*, **169**, 2730-2743.
- Lumbreras, V., Stevens, D. R. und Purton, S. (1998). "Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron." *The Plant Journal*, **14**, 441-447.
- Lurling, M. und Beekman, W. (2006). "Palmelloids formation in *Chlamydomonas reinhardtii* : defence against rotifer predators?" *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.*, **42**, 65-72.
- Lynch, S. R. und Puglisi, J. D. (2001). "Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes" Edited by I. Tinoco." *Journal of Molecular Biology*, **306**, 1037-1058.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. und Koonin, E. V. (2006). "A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action." *Biology direct*, **1**, 7-7.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. und Gorbunova, V. (2008). "Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells." *DNA Repair*, **7**, 1765-1771.

- Mateos-Gomez, P. A., Gong, F., Nair, N., Miller, K. M., Lazzerini-Denchi, E. und Sfeir, A. (2015). "Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination." *Nature*, **518**, 254-257.
- Mayfield, S. P., Franklin, S. E. und Lerner, R. A. (2003). "Expression and assembly of a fully active antibody in algae." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 438-442.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L.-H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S. M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.-L., Cognat, V., Croft, M. T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P. A., Lemaire, S. D., Lobanov, A. V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J. V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A. M., Niyogi, K., Novoselov, S. V., Paulsen, I. T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.-P., Riaño-Pachón, D. M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S. L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.-J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M. R., Ledford, H., Long, J. C., Minagawa, J., Page, M. D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A. M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C. L., Gladyshev, V. N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R. T., Brokstein, P., et al. (2007). "The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions." *Science (New York, N.Y.)*, **318**, 245-250.
- Meyerowitz, E. M. (1989). "Arabidopsis, a useful weed." *Cell*, **56**, 263-269.
- Miki, D., Zhang, W., Zeng, W., Feng, Z. und Zhu, J.-K. (2018). "CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in Arabidopsis using sequential transformation." *Nature Communications*, **9**, 1967.
- Minagawa, J. und Crofts, A. R. (1994). "A robust protocol for site-directed mutagenesis of the D1 protein in *Chlamydomonas reinhardtii*: A PCR-spliced *psbA* gene in a plasmid conferring spectinomycin resistance was introduced into *apsbA* deletion strain." *Photosynthesis Research*, **42**, 121-131.
- Mitchell, M. C., Metodieva, G., Metodiev, M. V., Griffiths, H. und Meyer, M. T. (2017). "Pyrenoid loss impairs carbon-concentrating mechanism induction and alters primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Journal of Experimental Botany*, **68**, 3891-3902.
- Mittag, M. und Wagner, V. (2003). "The Circadian Clock of the Unicellular Eukaryotic Model Organism *Chlamydomonas reinhardtii*." **384**, 689-695.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C. s., García-Martínez, J. und Soria, E. (2005). "Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements." *Journal of Molecular Evolution*, **60**, 174-182.
- Mojica, F. J. M., Ferrer, C., Juez, G. und Rodríguez-Valera, F. (1995). "Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning." *Molecular Microbiology*, **17**, 85-93.
- Moroney, J. V. und Somanchi, A. (1999). "How Do Algae Concentrate CO₂ to Increase the Efficiency of Photosynthetic Carbon Fixation?1." *Plant Physiology*, **119**, 9-16.
- Nash, R. A., Caldecott, K. W., Barnes, D. E. und Lindahl, T. (1997). "XRCC1 Protein Interacts with One of Two Distinct Forms of DNA Ligase III." *Biochemistry*, **36**, 5207-5211.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Venter, J. C. und Fraser, C. M. (1999). "Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*." *Nature*, **399**, 323-329.

- Nickelsen, J. und Kück, U. (2000). "The Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an Experimental System to Study Chloroplast RNA Metabolism." *Naturwissenschaften*, **87**, 97-107.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, Patrick D., Konermann, S., Shehata, Soraya I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F. und Nureki, O. (2014). "Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA." *Cell*, **156**, 935-949.
- Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A. und Egelman Edward, H. (1993). "Similarity of the Yeast RAD51 Filament to the Bacterial RecA Filament." *Science*, **259**, 1896-1899.
- Ohad, I., Siekevitz, P. und Palade, G. E. (1967). "BIOGENESIS OF CHLOROPLAST MEMBRANES : I. Plastid Dedifferentiation in a Dark-Grown Algal Mutant (*Chlamydomonas reinhardtii*)." *Journal of Cell Biology*, **35**, 521-552.
- Pannunzio, N. R., Watanabe, G. und Lieber, M. R. (2018). "Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks." *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 10512-10523.
- Park, R. V., Asbury, H. und Miller, S. M. (2020). "Modification of a *Chlamydomonas reinhardtii* CRISPR/Cas9 transformation protocol for use with widely available electroporation equipment." *MethodsX*, **7**, 100855.
- Patchsung, M., Jantarug, K., Pattama, A., Aphicho, K., Suraritdechachai, S., Meesawat, P., Sappakhaw, K., Leelahakorn, N., Ruenkam, T., Wongsatit, T., Athipanyasilp, N., Eiamthong, B., Lakkanasirorat, B., Phoodokmai, T., Niljianskul, N., Pakotiprapha, D., Chanarat, S., Homchan, A., Tinikul, R., Kamutira, P., Phiwkaow, K., Soithongcharoen, S., Kantiwiriyanitch, C., Pongsupasa, V., Trisrivirat, D., Jaroensuk, J., Wongnate, T., Maenpuen, S., Chaiyen, P., Kamnerdnakta, S., Swangsri, J., Chuthapisith, S., Sirivatanauksorn, Y., Chaimayo, C., Sutthent, R., Kantakamalakul, W., Joung, J., Ladha, A., Jin, X., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Zhang, F., Horthongkham, N. und Uttamapinant, C. (2020). "Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA." *Nature Biomedical Engineering*, **4**, 1140-1149.
- Patel, N., Atack, J. M., Finger, L. D., Exell, J. C., Thompson, P., Tsutakawa, S., Tainer, J. A., Williams, D. M. und Grasby, J. A. (2012). "Flap endonucleases pass 5'-flaps through a flexible arch using a disorder-thread-order mechanism to confer specificity for free 5'-ends." *Nucleic Acids Research*, **40**, 4507-4519.
- Perozeni, F., Cazzaniga, S., Baier, T., Zanoni, F., Zoccatelli, G., Lauersen, K. J., Wobbe, L. und Ballottari, M. (2020). "Turning a green alga red: engineering astaxanthin biosynthesis by intragenic pseudogene revival in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Biotechnology Journal*, **18**, 2053-2067.
- Pootakham, W., Gonzalez-Ballester, D. und Grossman, A. R. (2010). "Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in *Chlamydomonas*." *Plant Physiology*, **153**, 1653-1668.
- Pourcel, C., Salvignol, G. und Vergnaud, G. (2005). "CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies." *Microbiology*, **151**, 653-663.
- Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U. G. und Melkonian, M. (2001). "Molecular Phylogeny and Taxonomic Revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas Ehrenberg* and *Chloromonas Gobi*, and Description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov.* *In memory of Hanus Ettl (1931-1997), promoter of the systematics of the genus." *Protist*, **152**, 265-300.
- Purton, S. und Rochaix, J.-D. (1994). "Complementation of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant using a genomic cosmid library." *Plant Molecular Biology*, **24**, 533-537.
- Quadros, R. M., Miura, H., Harms, D. W., Akatsuka, H., Sato, T., Aida, T., Redder, R., Richardson, G. P., Inagaki, Y., Sakai, D., Buckley, S. M., Seshacharyulu, P., Batra, S. K., Behlke, M. A., Zeiner, S. A., Jacobi, A. M., Izu, Y., Thoreson, W. B., Urness, L. D., Mansour, S. L., Ohtsuka, M. und Gurumurthy, C. B. (2017). "Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins." *Genome Biology*, **18**, 92.

- Riballo, E., Woodbine, L., Stiff, T., Walker, S. A., Goodarzi, A. A. und Jeggo, P. A. (2009). "XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV–XRCC4 re-adenylation following ligation." *Nucleic Acids Research*, **37**, 482-492.
- Robinson, C. und Klösigen, R. B. (1994). "Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane — a multitude of mechanisms." *Plant Molecular Biology*, **26**, 15-24.
- Scheeff, E. D. und Bourne, P. E. (2005). "Structural evolution of the protein kinase-like superfamily." *PLoS computational biology*, **1**, e49.
- Schroda, M., Blöcker, D. und Beck, C. F. (2000). "The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*." *The plant journal*, **21**, 121-131.
- Sherba, J. J., Hogquist, S., Lin, H., Shan, J. W., Shreiber, D. I. und Zahn, J. D. (2020). "The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency." *Scientific reports*, **10**, 3053.
- Shi, X., Shou, J., Mehryar, M. M., Li, J., Wang, L., Zhang, M., Huang, H., Sun, X. und Wu, Q. (2019). "Cas9 has no exonuclease activity resulting in staggered cleavage with overhangs and predictable di- and tri-nucleotide CRISPR insertions without template donor." *Cell discovery*, **5**, 53.
- Shin, S.-E., Lim, J.-M., Koh, H. G., Kim, E. K., Kang, N. K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W.-S., Lee, B., Hwangbo, K., Kim, J., Ye, S. H., Yun, J.-Y., Seo, H., Oh, H.-M., Kim, K.-J., Kim, J.-S., Jeong, W.-J., Chang, Y. K. und Jeong, B.-r. (2016). "CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Scientific Reports*, **6**, 27810.
- Shou, H., Frame, B. R., Whitham, S. A. und Wang, K. (2004). "Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation." *Molecular Breeding*, **13**, 201-208.
- Sibanda, B. L., Chirgadze, D. Y. und Blundell, T. L. (2010). "Crystal structure of DNA-PKcs reveals a large open-ring cradle comprised of HEAT repeats." *Nature*, **463**, 118-121.
- Sizova, I. A., Lapina T.V.
- Frolova, O. N., Alexandrova, N. N., Akopiants, K. E. und Danilenko, V. N. (1996). "Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with a *Streptomyces rimosus* gene as the selective marker." *Gene*, **181**, 13-18.
- Spudich, J. L. und Sager, R. (1980). "Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark." *The Journal of cell biology*, **85**, 136-145.
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C. und Doudna, J. A. (2014). "DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9." *Biophysical Journal*, **106**, 695a.
- Stevens, D. R., Purton, S. und Rochaix, J.-D. (1996). "The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*." *Molecular and General Genetics MGG*, **251**, 23-30.
- Sugawara, N. und Haber, J. E. (1992). "Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation." *Molecular and cellular biology*, **12**, 563-575.
- Sun, M., Qian, K., Su, N., Chang, H., Liu, J. und Shen, G. (2003). "Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast." *Biotechnology Letters*, **25**, 1087-1092.
- Sy, S. M. H., Huen, M. S. Y. und Chen, J. (2009). "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 7155.
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A. und Takeda, S. (1998). "Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells." *The EMBO journal*, **17**, 5497-5508.

- The Arabidopsis Genome, I. (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature*, **408**, 796-815.
- Thompson, P. R., Boehr, D. D., Berghuis, A. M. und Wright, G. D. (2002). "Mechanism of aminoglycoside antibiotic kinase APH (3'-IIIa: role of the nucleotide positioning loop." *Biochemistry*, **41**, 7001-7007.
- Thompson, P. R., Hughes, D. W. und Wright, G. D. (1996). "Mechanism of aminoglycoside 3'-phosphotransferase type IIIa: His188 is not a phosphate-accepting residue." *Chemistry & Biology*, **3**, 747-755.
- Trenner, A. und Sartori, A. A. (2019a). "Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment." *Frontiers in Oncology*, **9**, 1388.
- Trenner, A. und Sartori, A. A. (2019b). "Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment." *Frontiers in Oncology*, **9**.
- Truong, L. N., Li, Y., Shi, L. Z., Hwang, P. Y.-H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M. W. und Wu, X. (2013). "Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 7720.
- Tunçay, H., Findinier, J., Duchêne, T., Cogez, V., Cousin, C., Peltier, G., Ball, S. G. und Dauvillée, D. (2013). "A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism." *PLOS ONE*, **8**, e74763.
- Walker, J. R., Corpina, R. A. und Goldberg, J. (2001). "Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair." *Nature*, **412**, 607-614.
- Wang, B., Li, K., Wang, A., Reiser, M., Saunders, T., Lockey, R. F. und Wang, J. W. (2015). "Highly efficient CRISPR/HDR-mediated knock-in for mouse embryonic stem cells and zygotes." *Biotechniques*, **59**(4), 206-8.
- Wang, L., Yang, L., Wen, X., Chen, Z., Liang, Q., Li, J. und Wang, W. (2019). "Rapid and high efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by square-wave electroporation." *Bioscience reports*, **39**, BSR20181210.
- Yaneva, M., Kowalewski, T. und Lieber, M. R. (1997). "Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies." *The EMBO Journal*, **16**, 5098-5112.
- Yang, H., Wang, H. und Jaenisch, R. (2014). "Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering." *Nature Protocols*, **9**, 1956-1968.
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L. und Jaenisch, R. (2013). "One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering." *Cell*, **154**, 1370-1379.
- Yildiz, F. H., Davies, J. P. und Grossman, A. R. (1994). "Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth." *Plant Physiology*, **104**, 981-987.
- Yu, Y., Guo, Y., Tian, Q., Lan, Y., Yeh, H., Zhang, M., Tasan, I., Jain, S. und Zhao, H. (2020). "An efficient gene knock-in strategy using 5'-modified double-stranded DNA donors with short homology arms." *Nature Chemical Biology*, **16**, 387-390.
- Yun, M. H. und Hiom, K. (2009). "CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle." *Nature*, **459**, 460-463.
- Zhang, R., Patena, W., Armbruster, U., Gang, S. S., Blum, S. R. und Jonikas, M. C. (2014). "High-Throughput Genotyping of Green Algal Mutants Reveals Random Distribution of Mutagenic Insertion Sites and Endonucleolytic Cleavage of Transforming DNA." *The Plant Cell*, **26**, 1398-1409.
- Zhang, Z., Hu, W., Cano, L., Lee, T. D., Chen, D. J. und Chen, Y. (2004). "Solution Structure of the C-Terminal Domain of Ku80 Suggests Important Sites for Protein-Protein Interactions." *Structure*, **12**, 495-502.
- Zhang, Z., Zhu, L., Lin, D., Chen, F., Chen, D. J. und Chen, Y. (2001). "The Three-dimensional Structure of the C-terminal DNA-binding Domain of Human Ku70*." *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 38231-38236.

- Zheng, Z., Chen, T., Zhao, M., Wang, Z. und Zhao, X. (2012). "Engineering Escherichia coli for succinate production from hemicellulose via consolidated bioprocessing." *Microbial cell factories*, **11**, 1-11.
- Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E. Y., Lee, S. E. und Ira, G. (2008). "Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends." *Cell*, **134**, 981-994.
- Zorin, B., Hegemann, P. und Sizova, I. (2005). "Nuclear-gene targeting by using single-stranded DNA avoids illegitimate DNA integration in Chlamydomonas reinhardtii." *Eukaryotic cell*, **4**, 1264-1272.
- Zorin, B., Lu, Y., Sizova, I. und Hegemann, P. (2009). "Nuclear gene targeting in Chlamydomonas as exemplified by disruption of the PHOT gene." *Gene*, **432**, 91-96.
- Zuo, Z. und Liu, J. (2016). "Cas9-catalyzed DNA cleavage generates staggered ends: evidence from molecular dynamics simulations." *Scientific reports*, **6**, 37584.

Lehrbuch

"The Chlamydomonas source book", Elsevier, 2009, Harris, E.H. (Hrsg.)

Links

Definition des Begriffs Bioökonomie: https://www.bmbf.de/bmbf/de/forschung/energiewende-und-nachhaltiges-wirtschaften/biooekonomie/biooekonomie_node.html (Stand: Dez 2023)

Deutsches Startup „COLIPI“: www.bionity.com (Stand: Dez 2023)

Geobacter sulfurreducens als biologische Brennstoffzelle:

<https://www.sueddeutsche.de/wissen/bakterien-strom-energie-1.4619193> (Stand: Dez 2023)

Chlamydomonas Stammsammlung und Vektorsammlung: <https://www.chlamycollection.org> (Stand: Dez 2023)

DOE-Projekt, Sequenzierung des *C. reinhardtii* Stamms CC-503 cw92 (mt+): GeneBank assembly accession: GCA_000002595.3;

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000002595.3/ sowie DDBJ/EMBL/GeneBank Accession#: ABCN00000000; www.jgi.doe.gov/chlamy (Stand: 26. Jan 2018)

E. coli K12 Genome Browser, Accession: eschColi_K12, http://microbes.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=eschColi_K12 (Stand: Okt 2021)

Link zum Chondrom von *C. reinhardtii*:

https://mycocosm.jgi.doe.gov/Chlre5_6/organelle/mitochondria (Stand: Okt 2021)

Link zum Plastom von *C. reinhardtii*:

(https://mycocosm.jgi.doe.gov/Chlre5_6/organelle/chloroplast) (Stand: Okt 2021)

iGEM-Projekt 2019 der Humboldt Universität sowie der TU Kaiserslautern: startnext.com/igemhu2019&2019.igem.org/Team:Humboldt_Berlin/Results sowie 2019.igem.org/Team:TU_Kaiserslautern; iGEM: *international genetically engineered machine competition*, Wettbewerb des MIT in Boston, seit 2003 (Stand: Okt 2021)

BAC-Bibliothek: <https://www.chlamycollection.org/resources/maps/bac-maps/>

(Stand: Okt 2021)

Zhangs *Lab Web tool*: <https://zlab.bio/guide-design-resources> (Stand: Dez 2023)

Online tool für die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit für *Off-targets* im Karyom von *C. reinhardtii*: <http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR> (Stand: Dez 2023)

8 Anhang

8.1 Vektorkarten und Sequenzinformationen

Sequenzinformationen zu den verwendeten DNA-Repair-Donoren

Folgende Kürzel wurden bei der Annotierung verwendet:

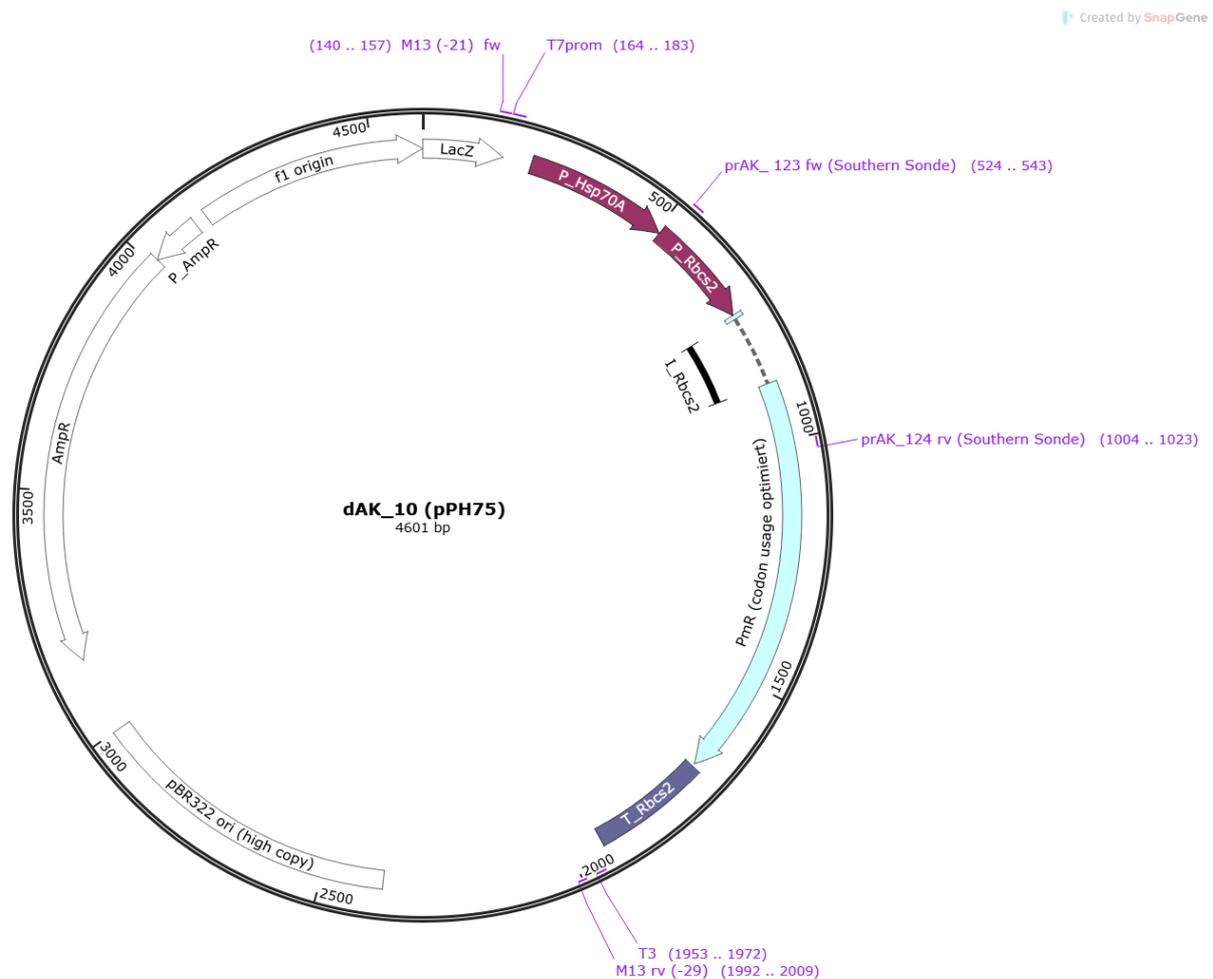
P_: Promotor; I_: Intron; T_: Terminator; Pm^R: Paromomycin-Resistenz; Amp^R: Ampicillin-Resistenz; prAK_: Primer (vorliegende Arbeit);

alle Sequenzen der DNA-Reparatur-Donoren befinden sich als dna-files im digitalen Anhang

Vektorkarte DNA-Reparatur-Donor dAK_10 (pPH75)

Geschenk von der AG Peter Hegemann, HU Berlin

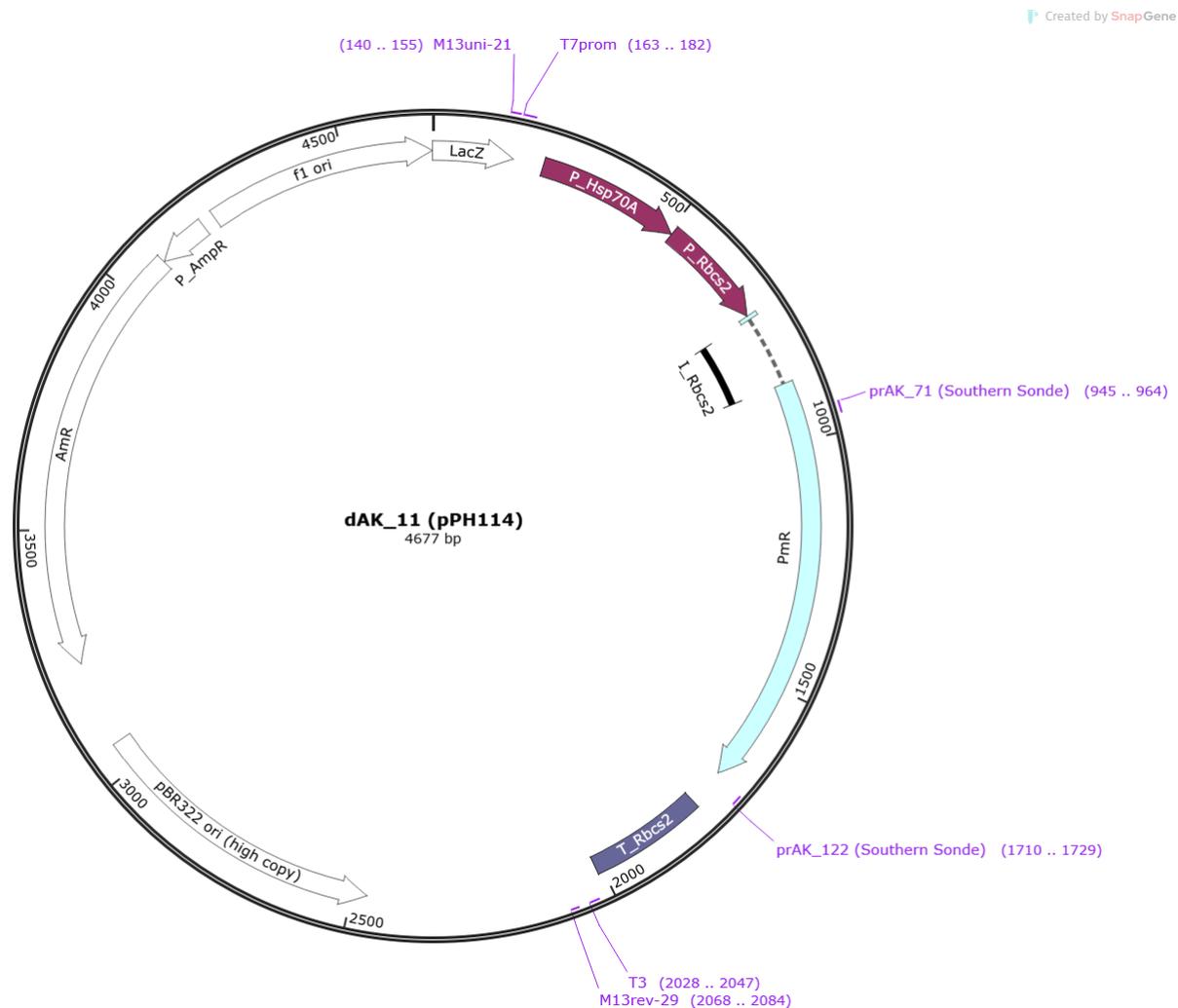
Nachfolgeplasmid des pPH114, Paromomycin-Resistenzkassette *codon usage* optimiert



Vektorkarte DNA-Reparatur-Donor dAK_11 (pPH114)

Geschenk von der AG Peter Hegemann, HU Berlin

Paromomycin-Resistenzkassette ist nicht *codon usage* optimiert

DNA-Reparatur-Donor dAK_13 (M13-Amplikon pPH114)

Der DNA-Reparatur-Donor dAK_13 entspricht dem PCR-Produkt, welches bei der Nutzung der M13-Primer entsteht. Dieser Donor ist linear, doppelsträngig und enthält keine homologen Bereiche für den *SNRK2.2*-Lokus von *C. reinhardtii*. Die Fragmentlänge beträgt 1946 bp.

DNA-Reparatur-Donor dAK_8 & 9 (ssODN8 & 9)

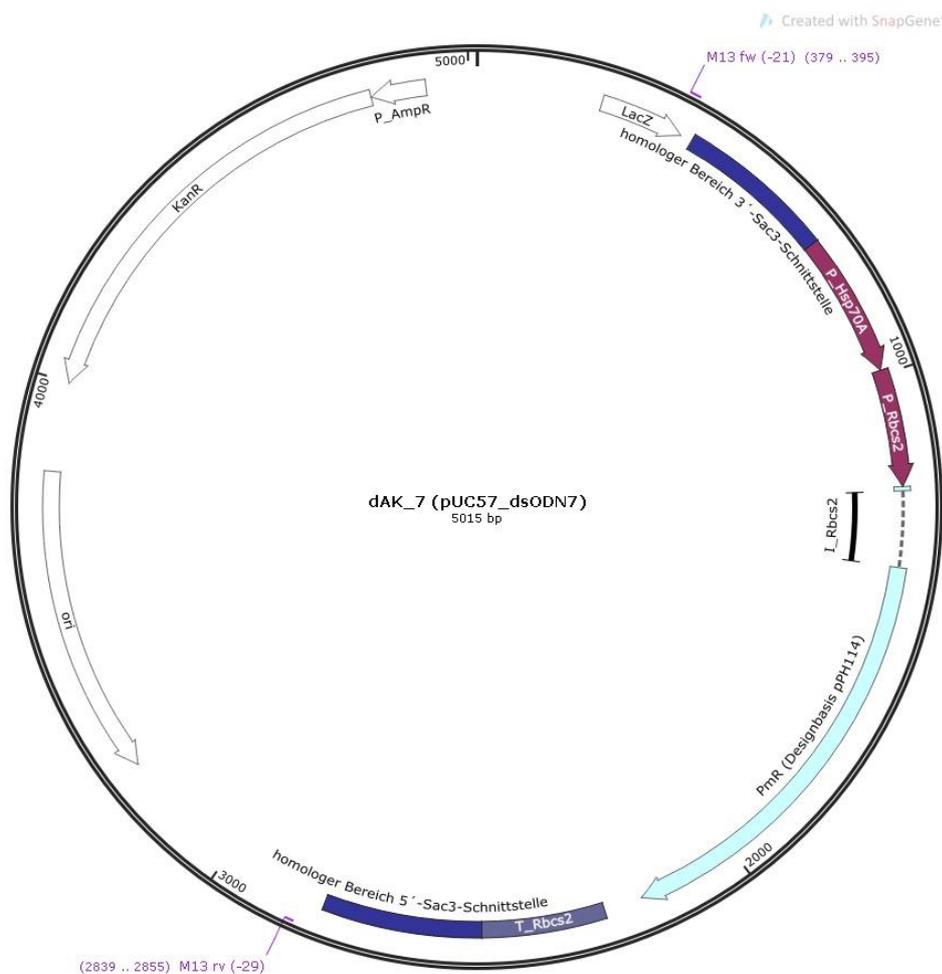
Die DNA-Reparatur-Donoren dAK_8 & 9 sind einzelsträngig und entsprechen der Sequenz der Paromomycin-Resistenzkassette des Plasmiden pPH114; zusätzlich enthalten sind homologe Bereiche für den *SNRK2.2*-Lokus von *C. reinhardtii* (je 300 bp). dAK_8 ist *sense*,

dAK_9 *antisense*. Die Fragmentlänge beträgt jeweils 2377 bp. Es handelt sich um synthetisch hergestellte DNA-Stränge, bezogen von der Firma GENEWIZ.

Vektorkarte DNA-Reparatur-Donor dAK_7 (pUC57_dsODN7)

Synthetischer Plasmid, bezogen von der Firma Biocat;

Designbasis für die Paromomycin-Resistenzkassette: pPH114; flankiert von Bereichen, welche homolog zu der Sequenz im *SNRK2.2*-Lokus an der Schnittstelle sind, Größe: 5015 bp.



DNA-Reparatur-Donor dAK_12 (M13-Amplikon pUC57_dsODN7)

Der DNA-Reparatur-Donor dAK_12 entspricht dem PCR-Produkt, welches bei der Nutzung der M13-Primer entsteht. Dieser Donor ist linear, doppelsträngig und enthält homologen Bereiche für den *SNRK2.2*-Lokus von *C. reinhardtii* (je 300 bp). Die Fragmentlänge beträgt 2389 bp.

8.2 Hinweise zur Nutzung des digitalen Anhangs

Der digitale Anhang enthält die digitale Version aller in der vorliegenden Arbeit genutzten Sequenzen. Die Dateien wurden mit SnapGene erstellt. Die Annotierungen und Primerbindestellen sind in diesen Dateien abrufbar, ebenso diverse Restriktionsenzym-Bindestellen. Mit Hilfe des kostenfreien SnapGene Viewers sind diese Annotierungen sichtbar. Die „dna-files“ sind aber natürlich auch mit jeder sonst gängigen Software zu öffnen, ggf. aber unter dem Verlust einiger Annotierungen.

Im digitalen Anhang befinden sich mehrere Ordner. Im Ordner 1 sind die „dna“-Dateien des WT im *SNRK2.2*-Lokus sowie der DNA-Reparatur-Donoren zu finden. Im Ordner 2 befinden sich die gleichen „dna“-Dateien wie in Ordner 1, nur dass in diesen Dateien Sequenzabgleiche (*alignments*) hinterlegt sind. Diese können von allen Viewer-Versionen ab 5.3 eingesehen werden, indem der *alignment button*  geklickt wird. Die dafür genutzten originalen „ab1“-Dateien befinden sich im selben Ordner. Die Sequenziererergebnisse „ab1“ für die Farbttest-positiven CRISPR-Klone im Bereich des DSBs sind in Ordner 3 zu finden. Die Sequenzabgleiche sind auch hier über das Öffnen der „dna“-Dateien und das Klicken des *alignment buttons* aufrufbar. Die Sequenzierdaten für die im *SNRK2.2*-Lokus inserierten Sequenzen befinden sich in Ordner 4, ebenfalls als „dna“- und „ab1“-Dateien.

Hinweis zur Validierung der Sequenzen der DNA-Reparatur-Donoren dAK_8 und 9 (Transformationsansätze #10 und 11): Abstellproben dieser Sequenzen wurden vom Hersteller sequenziert. Es liegen deshalb keine Sequenzdateien im digitalen Anhang.

8. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name **Anne Kind**
geboren in Dresden

Beruflicher Werdegang

- Seit 07.2023 **wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Qualitätskontrolle (GMP) am Standort Bernburg, Abteilung Mikrobiologie**
Etablierung einer Analysemethode (VITEK® 2 compact) als Nachweismethode möglicher Kontaminanten
Serumwerk Bernburg
- 11.2021 – 06.2023 **wissenschaftliche Mitarbeiterin in F & E (Forschung und Entwicklung)**
Entwicklung von Vakzinen für die Veterinärmedizin
SerYmun Yeast GmbH, Halle
- 09.2020 – 11.2021 **Sonstiges**
Elternzeit (bis 04.2021), Bewerbungsphase
- 11.2016 - 08.2020 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
gentechnische Forschung und Entwicklung - Doktorarbeit, Seminare und Praktika Biotechnologie und Pharmazie
Institut für Pharmazie, AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
befristet
- 06.2014 - 08.2014 **Studentische Hilfskraft**
Herstellung von Proteinen aus Coli-Bakterien
Biozentrum Halle, AG Prof. Dr. M. Pietzsch
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
vorbereitende Finanzierung Auslandsstudium
- 08.2012 **Tierpflegerin**
Produktion transgener Mäuse, Seminar EU-Tierschutz
Institut für Labortierkunde
Veterinärmedizinische Universität Wien
Praktikum
- 09.2009 - 06.2010 **Au Pair**
CAE Sprachausbildung King Street College London

Bildungsweg

- 11.2016 - derzeit **Studium**
Biotechnologie
Doktorarbeit: Etablierung einer methodischen Plattform zur genetischen Veränderung einer Mikroalge
Institut für Pharmazie, AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 10.2013 - 09.2016 **Studium**
Biochemie, Wahlfächer u.a. Biotechnologie, Strukturbiologie, Virologie
09.2014 - 12.2014 Forschungsgruppenpraktikum Biochemie
Abschlussarbeit: Grundlagenforschung zur Pflanzenimmunität
National University of Ireland, Maynooth, ERASMUS+ Stipendium
Masterarbeit: Untersuchungen zur enzymkatalytischen Umwandlung von Methan zu Methanol
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Master of Science
- 10.2010 - 09.2013 **Studium**
Biochemie, Wahlfach Biotechnologie
Bachelorarbeit: Charakterisierung zweier Proteine für pflanzliche Immunsysteme
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Bachelor of Science
- 09.1997 - 08.2009 **Schulbildung**
bis 08.2001 Grundschule
Gymnasium Dresden-Cotta
Abschluss: Abitur

Halle / Saale, 08.01.2024

Anne Kind