

SONDERHEFT
2024

VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**MATERIAL-
FORSCHUNG**
Gesteinsbesiedelnde
Pilze

PFLANZENGENETIK
Genomsequenzen
sichtbar machen

EXPERIMENT
Pauline und die
Ausreißer

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT

CRISPR-Cas

... mehr als nur
Verteidigung

Den gesteinsbesiedelnden Pilzen auf der Spur CRISPR-Cas9 in der Materialforschung

JULIA SCHUMACHER



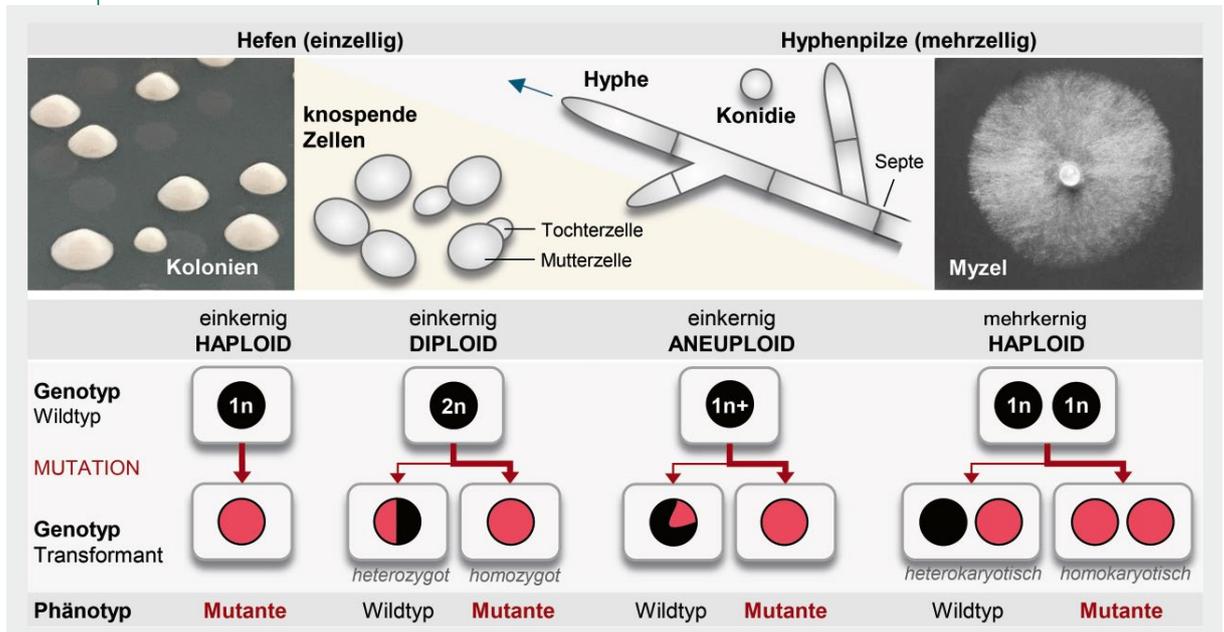
Das mikroskopische Leben auf exponierten Oberflächen ist genügsam und kooperativ. Gesteinsbesiedelnde schwarze Pilze, Grünalgen und Cyanobakterien unterstützen einander in der Eroberung von Felsen, Mauern, Denkmälern, Dächern, Fassaden und Sonnenkollektoren. Bedeutend sind die schwarzen Pilze als Gesteinszerstörer und Biofilmbildner. Ihre massiven Zellwände und ihr langsames Wachstum machen sie stresstolerant und fordern zugleich die experimentelle Forschung heraus. In der Materialforschung können Biofilme erwünscht oder unerwünscht sein. Biofilme auf Fassaden können das Innenstadtklima positiv beeinflussen, während sie auf einem Marmordenkmal unwillkommen sind. Ohne tieferes Verständnis der angepassten Mikroben ist weder ihre Bekämpfung noch ihre gezielte Förderung auf Materialien möglich. Hier treffen sich Genetik und Materialforschung: Die CRISPR-Cas9-Technologie ermöglicht es, die Genome der Pilze für funktionale Analysen zu editieren, um die Mechanismen der Materialbesiedlung und Materialschädigung zu entschlüsseln.

Pilze weisen eine erstaunliche Mannigfaltigkeit auf, angefangen bei ihrer Gestalt und Größe bis hin zu ihren Lebensräumen und Ernährungsstrategien. Dabei gibt es zwei grundlegende Wuchsformen (Abbildung 1): Hefen wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae* sind Einzeller, die sich vegetativ durch Knospung vermehren, indem eine Mutterzelle eine Tochterzelle abschnürt, die schließlich zur vollen Größe heranwächst. Die Zellwände können miteinander verbunden bleiben, so dass Zellketten entstehen. Die entstehenden Kolonien ähneln denen von Bakterien. Andere Pilze hingegen wie z. B. *Botrytis cinerea* sind unkonventionelle Mehrzeller: Sie bilden langgestreckte Zellfäden (Hyphen) und ein verzweigtes Netzwerk (Myzel), durch das sich Organellen und Zellkerne frei bewegen können. Ein Myzel, das ausgehend von einer Spore wächst, stellt einen Organismus dar. Pilze können sich vegetativ (asexuell) und/oder sexuell fortpflanzen. Charakteristisch für die Schimmelpilze ist die Bildung asexueller Sporen (Konidien).

Pilzzellen können funktionierende Genkopien/Allele in unterschiedlicher Anzahl aufweisen. Viele Pilze besitzen einen einfachen Chromosomensatz (Haploidie), wodurch die Mutation eines Gens immer zu einem Phänotyp führt (sofern das Gen eine sichtbare Funktion aufweist). Es kommen aber auch Diploidie und Aneuploidie vor. Die unterschiedliche Anzahl von Genkopien kann mehrere Gründe haben wie zum Beispiel das Vorkommen von essenziellen und zusätzlichen Chromosomen, die ungleiche Verteilung der Chromosomen während der Mitose oder aber eine Genomduplikation gefolgt vom Verlust einzelner Genkopien. Ferner können die Hyphensegmente und Konidien der Hyphenpilze mehrere, ggf. auch unterschiedliche Zellkerne beinhalten, was den einfachen Chromosomensatz kompensiert und zu ihrer Anpassungsfähigkeit beiträgt. In jedem Fall, in dem es mehrere Genkopien/Allele gibt, wird die gentechnische Veränderung wie das Einfügen einer Mutation nicht direkt zur Merkmalsausprägung führen, so dass weitere Schritte für den Erhalt von homozygoten bzw. homokaryotischen Stämmen notwendig sind.

Die Nutzung der CRISPR-Cas9-Technologie in Pilzen hat – je nach Empfänger – verschiedene Vorteile [1]. Da in einem Schritt mehrere identische Genkopien/Allele mutiert werden können, ist es möglich, unmittelbar homozy-

ABB. 1 | MORPHOLOGIE UND GENETIK DER PILZE



Oben: Pilze haben zwei unterschiedliche Wuchsformen. Beispielhaft dargestellt sind hier Kolonien von *Saccharomyces cerevisiae* und vegetatives Myzel von *Botrytis cinerea*. Unten: Die Anzahl der funktionierenden Genkopien bestimmt den Phänotyp nach dem Einfügen einer Mutation in das Wildtyp-Genom. Die Verwendung der CRISPR-Cas9-Technologie verschiebt das Gleichgewicht zugunsten des Mutanten-Phänotyps (dicke Pfeile).

gote bzw. homokaryotische Transformanten zu erzeugen. Davon unabhängig erhöhen Doppelstrangbrüche (DSB) die Editierungsfrequenzen durch die Aktivierung der endogenen DNA-Reparatursysteme. Die Zugabe von Donor-DNA mit einer Resistenzkassette für die Selektion ist vorteilhaft und erlaubt das Entfernen oder Inserieren von Sequenzen. Ferner können mehrere verschiedene Stellen im Genom gleichzeitig editiert werden.

Gesteinsbesiedelnde Pilze bilden kompakte schwarze Kolonien und sind extremotolerant

Die Besiedlung von exponierten Lebensräumen stellt eine besondere Herausforderung dar und erfordert häufig die Kooperation von verschiedenen Mikroorganismen [2]. Unabhängig vom Substrat sind die Mikroorganismen der Sonneneinstrahlung (UV-Strahlung), wechselnden Temperaturen und Feuchte ausgesetzt. Gesteinsoberflächen in kalten und heißen Wüsten sind extreme Lebensräume, in

denen zudem Nährstoffe rar sind. Verschiedene Vertreter der Schlauchpilze (Ascomyzeten) sind durch bestimmte morphologische und physiologische Eigenschaften an solche extremen Lebensräume angepasst. Dazu gehören einfache Entwicklungszyklen durch ausschließlich vegetative Vermehrung, also durch Zellteilung und Bildung mehrschichtiger, melanisierter Zellwände. Viele filamentöse Schlauchpilze bilden das schwarze 1,8-Dihydroxynaphthalin-(DHN)-Melanin und lagern es in die Wände von spezialisierten Infektions- oder Fortpflanzungsstrukturen ein. Im Gegensatz dazu bilden die sogenannten schwarzen Pilze – manchmal auch gesteinsbesiedelnde Pilze, mikrokoloniale Pilze oder schwarze Hefen genannt – fortwährend Melanin, das sie vor vielen abiotischen und biotischen Umweltfaktoren schützt, sie aber auch in ihrem Wachstum einschränkt [3]. Schließlich muss für die Abschnürung einer Tochterzelle die Melaninschicht wenigstens lokal aufgelöst werden. Alternativ bilden sich zwei Tochterzellen in der Mutterzelle, die durch Aufplatzen des Melaninpanzers entlassen werden (meristematisches Wachstum). Durch die Besiedlung von Gesteinen sind die schwarzen Pilze in der Bodenbildung involviert und für ihr Verwitterungspotenzial gegenüber weit verbreiteten Gesteinen wie Olivin bekannt [4, 5].

Diese Eigenschaften befähigen die schwarzen Pilze, menschengeschaffene Lebensräume – künstliche Wüsten wie Denkmäler, Gebäudefassaden, Dächer und Solaranlagen – zu besiedeln. Biofilme auf diesen Oberflächen sind mikrobielle Gemeinschaften aus schwarzen Pilzen, Bakterien und Grünalgen (Abbildung 2) und führen zur Ver-

IN KÜRZE

- **Gesteinsbesiedelnde schwarze Pilze** sind Bestandteil von grau-grünen Biofilmen.
- Schwarze Pilze sind vielfältig und in ähnlicher Weise **an extreme Umweltbedingungen angepasst**.
- Das langsame Wachstum und die massiven Zellwände der schwarzen Pilze **erschweren molekularbiologische und gentechnische Verfahren**.
- Mithilfe der **CRISPR-Cas9-Technologie** ist es jetzt möglich, die Genome schwarzer Pilze zu editieren.
- Aufgrund der zur Verfügung stehenden Methoden ist *Knufia petricola* ein **geeignetes Modell** für materialbesiedelnde Pilze.

färbung heller Oberflächen, Veränderung der Materialien und zur Reduzierung der Effizienz von Solaranlagen. Dabei tragen die Pilze zu der Verankerung des Biofilms bei und schützen die anderen Mikroorganismen durch ihre Melanisierung vor übermäßiger Lichteinstrahlung. Die schwarzen Pilze weisen mit zahlreichen Vertretern in den Klassen Arthoniomyzeten, Eurotiomyzeten und Dothideomyzeten eine außerordentliche Diversität auf, die aufgrund ihres ähnlichen Aussehens (Konvergenz) lange unterschätzt wurde. Ein laufendes Gemeinschaftsprojekt adressiert diese Wissenslücke, indem die Genome von ca. 100 bisher unbekannt Pilzen aus verschiedenen extremen Lebensräumen sequenziert werden [6] (<https://stresblackfungi.org/>). Unser Beitrag dazu sind 15 neue Arten, die von Solaranlagen in den USA und Deutschland isoliert wurden.

Etablierung von *Knufia petricola* als Modell für materialbesiedelnde Pilze

Knufia petricola (ehemals *Sarcinomyces petricola*, siehe Aufmacherbild) und andere *Knufia*-Arten wurden als Besiedler und Zersetzer von antikem Marmor im Mittelmeerraum ausgemacht [7-9]. Wurde zunächst angenommen, dass diese Vertreter sich eher in warmen Gebieten aufhalten, haben kürzlich Studien in der Antarktis gezeigt, dass sie auch Gesteine in Kaltwüsten besiedeln [10], was ihren extremotoleranten Charakter unterstreicht und auf eine weltweite Verbreitung hindeutet. Der *K. petricola*-Stamm A95 wurde in den 1990er Jahren von Anna A. Gorbushina von einer Marmoroberfläche in Athen, Griechenland, isoliert und aufgrund seines moderaten Wachstums und der einfacheren Handhabung im Vergleich zu anderen isolierten schwarzen Pilzen als Modell ausgewählt [3]. *K. petri-*

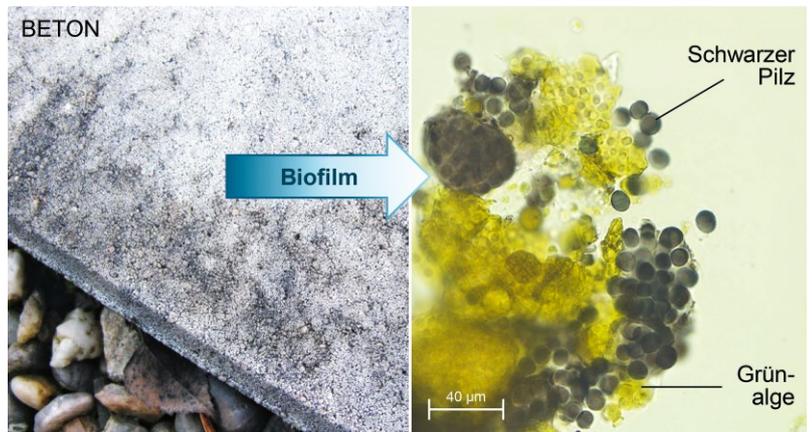
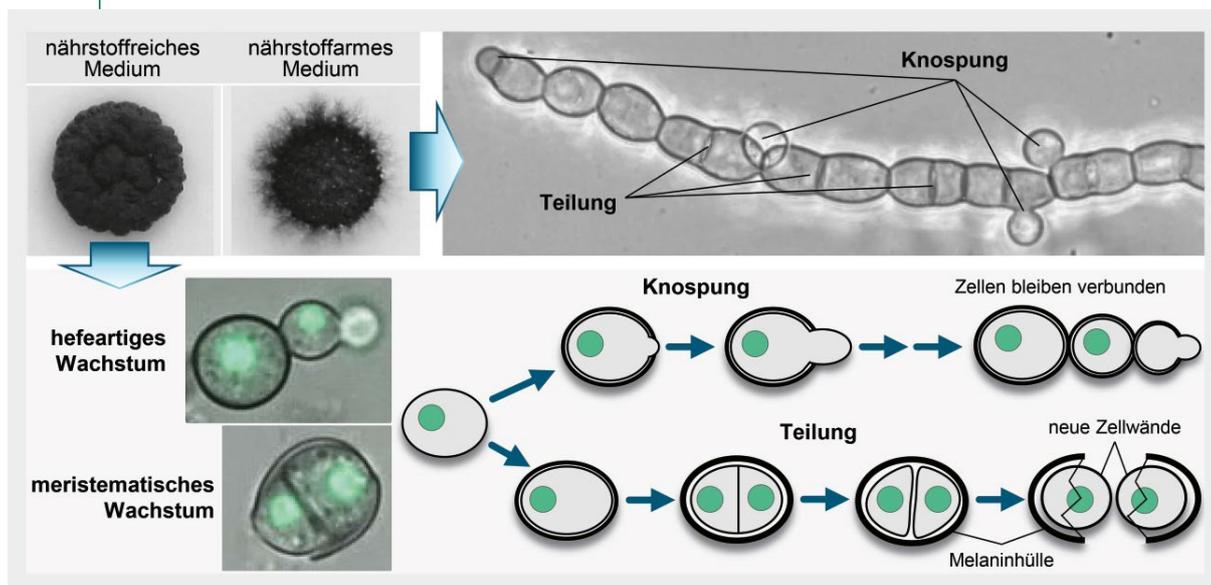


ABB. 2 Ein Biofilm mit schwarzen Pilzen und Grünalgen. Fotos: Pedro M. Martin-Sanchez.

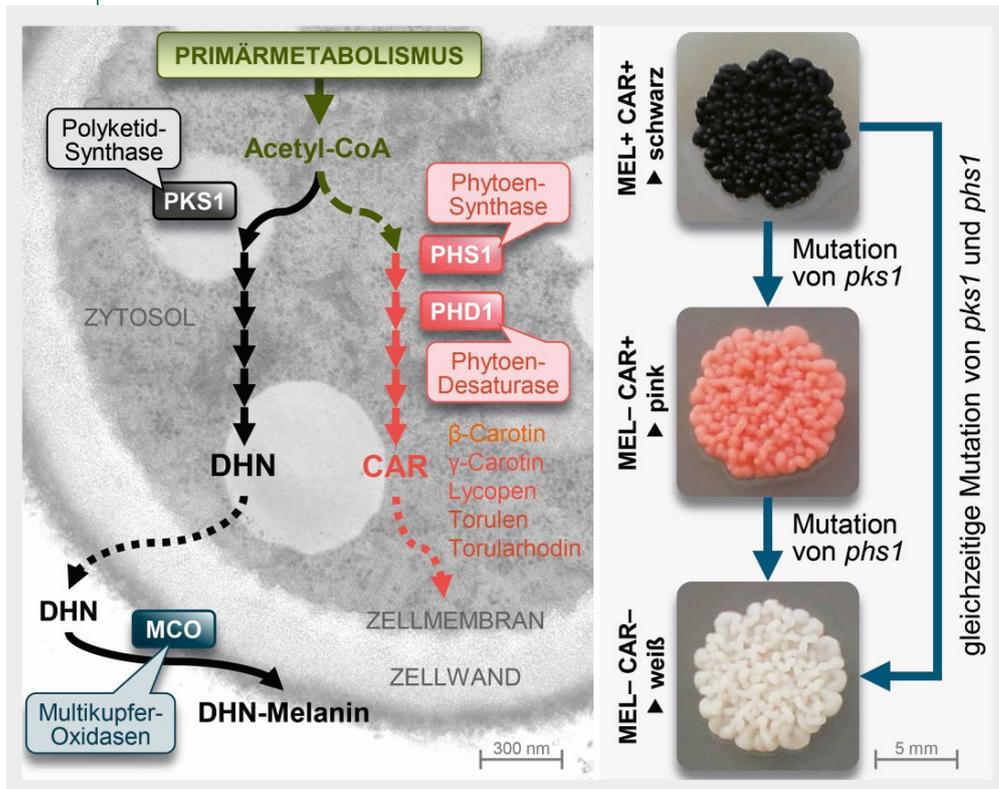
cola zeigt in Abhängigkeit vom Nährstoffgehalt des Mediums unterschiedliche Wachstumsformen (Abbildung 3). So basiert das schnellere Wachstum und die Bildung kompakter Kolonien auf nährstoffreichem Medium überwiegend auf der hefeartigen Teilung, die zu miteinander verbundenen Zellketten führt. Aber auch meristematisches Wachstum tritt auf – vermutlich der bevorzugte Teilungsmodus für ältere, stärker melanierte Zellen. Auf Wasseragar bilden die Zellen Pseudohyphen als Ergebnis hefeartiger und meristematischer Teilungen. *K. petricola* weist die weiteren Charakteristika der schwarzen Pilze auf, darunter die Bildung mehrschichtiger Zellwände und schützender Metabolite wie DHN-Melanin, Carotinoide, Mycosporine und extrazelluläre Polysaccharide (EPS). Die Vorstufe des schwarzen Melanins, 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN),

ABB. 3 | MORPHOLOGISCHE EINFACHHEIT DER SCHWARZEN PILZE



***Knufia petricola* vermehrt sich durch hefeartiges oder meristematisches Wachstum. Zellkerne sind durch Expression eines Fusionsproteins aus einem Histon und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) grün markiert.** Fotos: Oliver Voigt, Schema nach [8].

ABB. 4 | PIGMENTE VON *K. PETRICOLA*



***K. petricola* produziert zwei charakteristische Pigmente. 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN) wird in der äußeren Zellwand zu DNH-Melanin polymerisiert. Die Carotinoide (CAR) werden in die Membranen eingelagert. Die Mutation der Schlüsselenzym-kodierenden Gene *pks1* und *phs1* führt zum Verlust der Pigmente.** Aufnahme links: Polina Demytyeva [11].

wird in der Zelle produziert, sekretiert und außerhalb der Zelle polymerisiert [11] (Abbildung 4). Typisch für *K. petricola* ist die stetige Bildung rötlicher Carotinoide – in anderen Pilzen entstehen diese nur in Gegenwart von Licht –, die zu einer intensiven pinken Pigmentierung nicht-melanisierter Kolonien führt [12]. Die Carotinoide werden in die Membranen eingelagert und tragen damit vermutlich zur Aufrechterhaltung der Fluidität der Membranen bei wechselnden Temperaturen bei.

Das Genom von *K. petricola* ist mit einer Größe von 28,1 Mb und ca. 10.000 Genen sehr kompakt (Heeger et al., nicht veröffentlicht). Es enthält die konservierten Gene für die Synthese der Sekundärmetabolite DNH-Melanin, Carotinoide und eines mutmaßlichen Siderophors. Darüber hinaus sind keine Gene für die Synthese von (toxischen) Sekundärmetaboliten enthalten. Diese Beobachtung passt zu der Annahme, dass *K. petricola* in seiner natürlichen Umgebung nicht in Konkurrenz mit schneller wachsenden Mikroorganismen steht und mit anderen extremotoleranten Arten in Biofilmen koexistiert oder aber in einer symbiotischen Beziehung lebt. Bemerkenswert ist die Zahl von Genen, die für lichtabsorbierende Proteine (Photorezeptoren) kodieren [13]. Demnach könnte *K. petricola* die Fähigkeit besitzen, UV-A- und Infrarot-Strahlung sowie blaues, grünes und rotes Licht wahrzunehmen und

für die Steuerung des Metabolismus, einer inneren Uhr und die Interaktion mit phototrophen Mikroorganismen zu nutzen.

Wie die Anfärbung von Zellkernen und die Genomsequenzanalyse gezeigt haben, besitzen die Zellen von *K. petricola* je einen Zellkern mit einem einfachen Chromosomensatz. Damit sind die Voraussetzungen gegeben, dass Mutationen – sofern sie eingefügt werden können – zu sichtbaren Phänotypen führen.

K. petricola in den frühen Jahren – aller Anfang ist schwer

Kreativität und Ausdauer sind immer gefragt, wenn es um die Entwicklung neuer Methoden geht. Im Falle der schwarzen Pilze ist ferner viel Geduld erforderlich, denn abhängig von der Wachstumsrate des Forschungsobjekts müssen Wochen oder Monate vergehen, um genügend Biomasse zu erhalten bzw. um zu sehen, ob ein experimenteller Ansatz erfolgreich war. Neben dem langsamen Wachstum stellt das Melanin – auch als Verunreinigung – in vielen molekularbiologischen Methoden ein Problem dar.

Melanisierte Zellen bilden kompakte Kolonien und sind gut geschützt vor lysierenden Agenzien, so dass besondere (mechanische) Maßnahmen erforderlich sind, um Zellen zu trennen oder aufzuschließen. In beiden Fällen ist dennoch Feingefühl gefragt, da Zellen und Makromoleküle auch ungewollt geschädigt werden können. Daher stellen vermeintlich einfache Methoden wie die Extraktion von melaninfreier und hochmolekularer DNA für Genomsequenzierungen und diagnostischen Anwendungen schon eine Herausforderung dar. Diese wurde inzwischen für *K. petricola* gemeistert, und die gewonnenen Erfahrungen helfen bei der Übertragung auf andere schwarze Pilze. Aufgrund dieser technischen Schwierigkeiten ist bisher jedoch nicht viel über die Biologie der schwarzen Pilze bekannt.

Die größte Hürde für die Einschleusung von rekombinanter DNA (Transformation) in Pilze ist die Zellwand, die eine unterschiedliche Beschaffenheit in verschiedenen Arten aber auch in verschiedenen Zelltypen einer Art haben kann. Die wichtigste Methode stellt die Transformation von Protoplasten dar, da diese fast universell einsetzbar ist. Kritisch ist allerdings die Herstellung der Protoplasten, da nur wenige lytische Enzyme verfügbar sind, die die Zellwände verschiedener Pilze unterschiedlich gut abbauen. Sofern möglich wird junges vegetatives Myzel,

das kein Melanin oder andere Pigmente enthält, für die Zellwandlyse genutzt. Diese Möglichkeit gibt es für die schwarzen Pilze jedoch nicht. Die Parameter wurden für *K. petricola* so weit optimiert, dass Protoplasten – wenn auch nur sehr wenige – nach einer sehr langen Inkubation mit zellwandlytischen Enzymen (16 Stunden im Vergleich zu 1–2 Stunden bei nichtmelaniserten Myzelien filamentöser Pilze) erhalten werden können. Auch die Anreicherung bzw. Trennung der Protoplasten von den nicht-lysierten Zellen ist aufgrund der gleichen Größe schwierig, so dass die Protoplastensuspensionen immer noch melanisierte Zellen in unterschiedlichen Anteilen enthalten. Daher muss für die Selektion auf eine durch die Donor-DNA vermittelte Resistenz der entsprechende selektive Wirkstoff in ausreichend hoher Menge eingesetzt werden. Die erste erfolgreiche Transformation von Protoplasten führte durch ektopische (ungerichtete) Integration einer Hygromycin-Resistenzkassette zu Transformanten, die in Gegenwart von Hygromycin wachsen konnten [14] (Abbildung 5). Darauf aufbauend wurde das Protokoll weiter optimiert, *nat1*/Nourseothricin als zweites Selektionsmarkersystem implementiert und Expressionskassetten für rot- und grünfluoreszierende Proteine (RFP, GFP) ektopisch in das Genom von *K. petricola* integriert. Hierdurch wurde demonstriert, dass die Detektion von RFP- und GFP-Fluoreszenz trotz der stark melanisierten Zellwände möglich ist [15].

... und dann kam die CRISPR-Cas9-Technologie und veränderte die Welt ...

Die Möglichkeit *K. petricola* zu transformieren, erlaubte die Implementierung der CRISPR-Cas9-Technologie für die effiziente gerichtete Genomeditierung. Weil neben DNA auch Proteine in Protoplasten eingeschleust werden können, sind zwei Strategien für die transiente Bereitstellung der notwendigen Komponenten – zielspezifische sgRNA (*single guide-RNA*) und Cas9 – möglich (Abbildung 6):

(i) die *in-vitro*-Synthese der zielspezifischen sgRNA, die Assemblierung mit dem aufgereinigtem Cas9 und die Zugabe des Ribonukleoproteins (RNP) mit einer Donor-DNA zu den Protoplasten,

(ii) die Klonierung eines Plasmids mit Kassetten für die Expression der zielspezifischen sgRNA und Cas9 und die Zugabe des zirkulären Plasmids mit einer Donor-DNA zu den Protoplasten für die *in-vivo*-Assemblierung des RNP. Für den *in-vivo*-Ansatz werden Plasmide genutzt, die von Mortensen & Kollegen ursprünglich für die Verwendung in *Aspergillus*-Arten konzipiert wurden [16, 17].

Für die Etablierung neuer gentechnischer Methoden eignen sich besonders gut Gene, deren Verlust zu einem sichtbaren Phänotyp führt. Bei *K. petricola* sind es die Gene, die die Schlüsselenzyme für die Synthese von DHN-Melanin (*pks1*) und den Carotinoiden (*pbs1*) kodieren. Als erstes wurden die Effizienzen für die Deletion von *pks1* über Austausch gegen eine Resistenzkassette mit der herkömmlichen Methode und der CRISPR-Cas9-assistierten

Strategie verglichen (Abbildung 7). Hierfür bestand die Donor-DNA aus einer Resistenzkassette, die von unterschiedlich langen 5'- und 3'-nichtkodierenden Sequenzen von *pks1* flankiert wurde. Aufgrund der kompakten und verschiedenen pigmentierten Kolonien auf den Transformationsplatten konnten die Effizienzen (KO-Raten) durch das Auszählen der schwarzen und pinken Kolonien ermittelt werden. Die Ergebnisse demonstrieren sehr gut den Effekt der CRISPR-Cas9-vermittelten DSB in Schlauchpilzen.

Im Falle eines DSB im Zielgen (hier *pks1*) kann dieser durch homologe Rekombination (HR) unter Verwendung der bereitgestellten Donor-DNA (Resistenzkassette mit homologen Sequenzen) wieder geschlossen werden, wodurch das Zielgen gegen die Resistenzkassette ausgetauscht wird. Da durch das zielgerichtete Cas9 immer ein

ABB. 5 | TRANSFORMATION VON *K. PETRICOLA*-PROTOPLASTEN

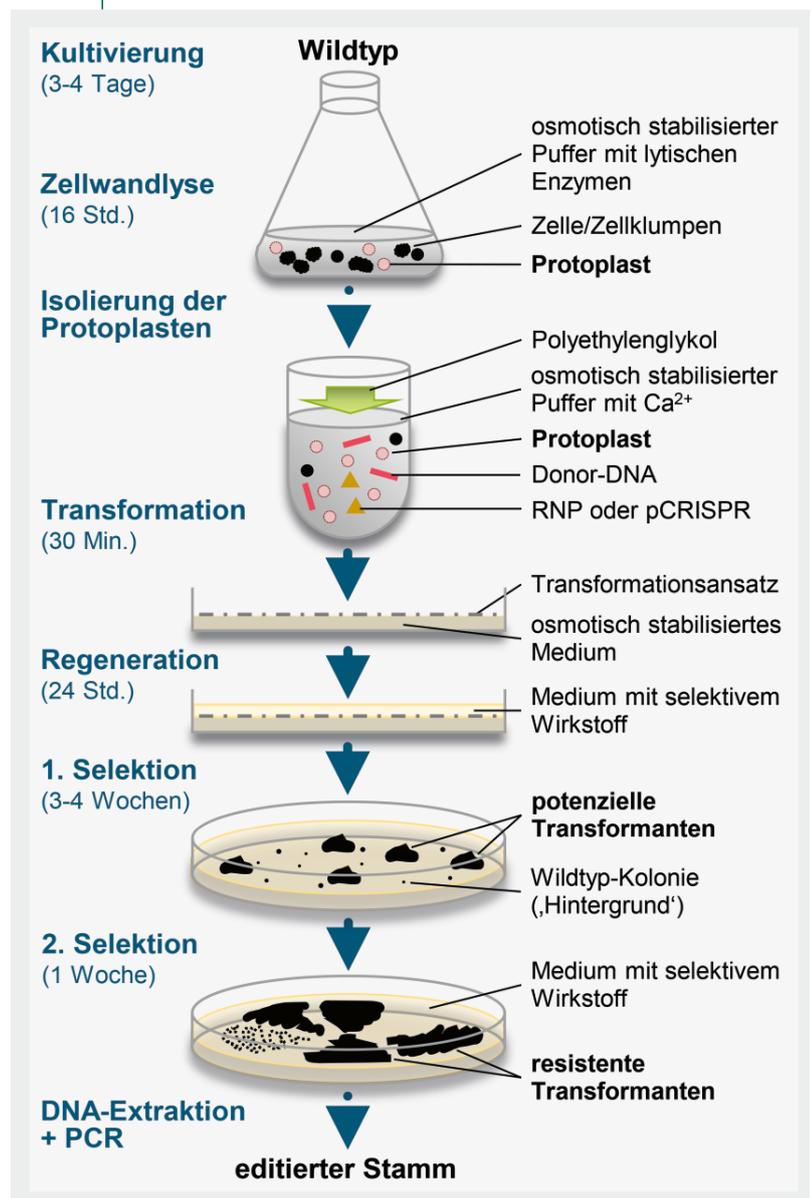
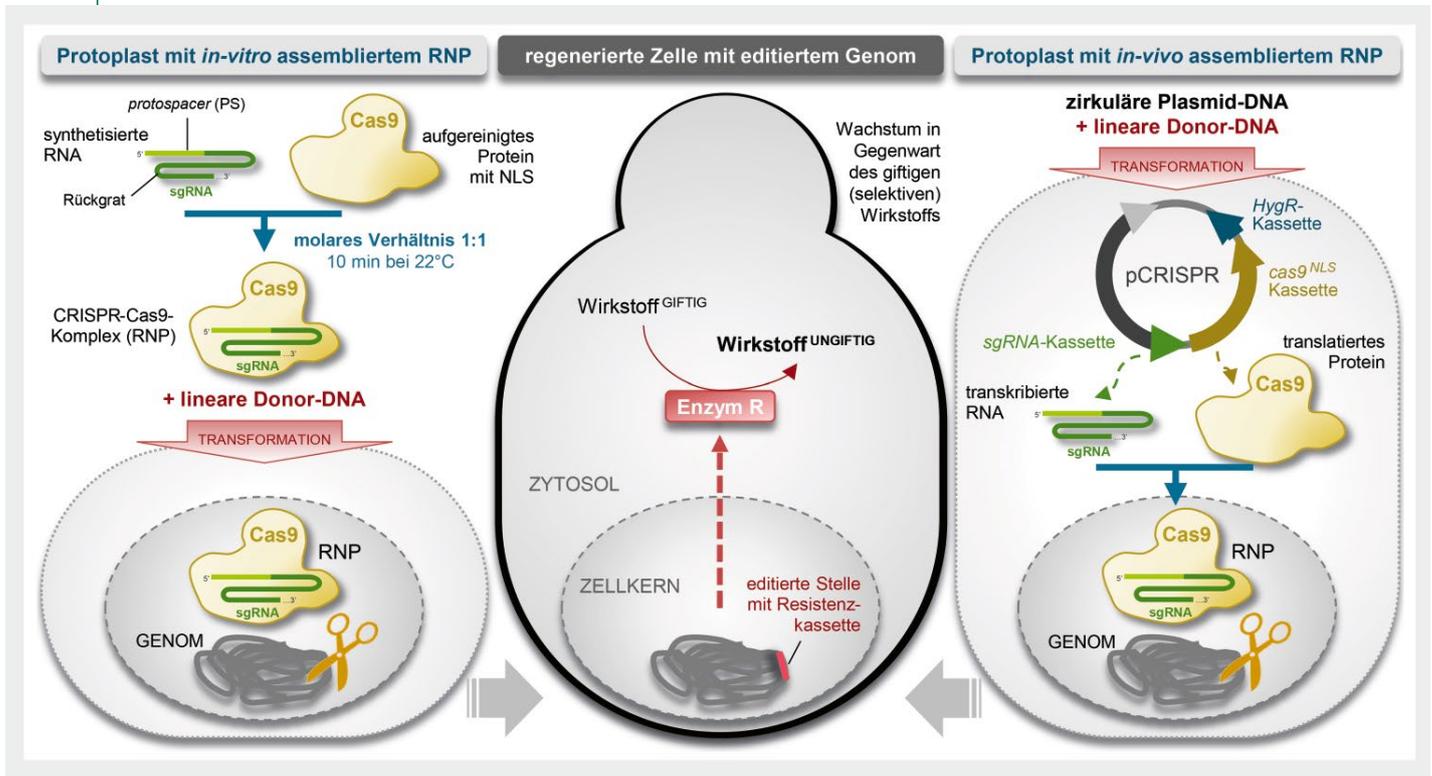


ABB. 6 | STRATEGIEN FÜR TRANSIENTES CRISPR-CAS9 BEI *K. PETRICOLA*



Protoplasten werden mit Donor-DNA für das Erzielen des gewünschten Rekombinationsereignisses sowie mit einem *in vitro* assemblierten Ribonukleoprotein (RNP) oder mit einem zirkulären Plasmid für die Expression von *cas9* und zielspezifischer sgRNA transformiert. Die Donor-DNA enthält eine Resistenzkassette (R) für die Selektion transformierter Zellen. Von einem Plasmid können gleichzeitig mehrere sgRNAs exprimiert werden (*multiplexing*), und eine transiente Selektion durch die kodierte Hygromycin-Resistenz (HygR) ist möglich. NLS (englisch: *nuclear localization signal*): Kernlokalisierungssequenz aus Simian-Virus 40.

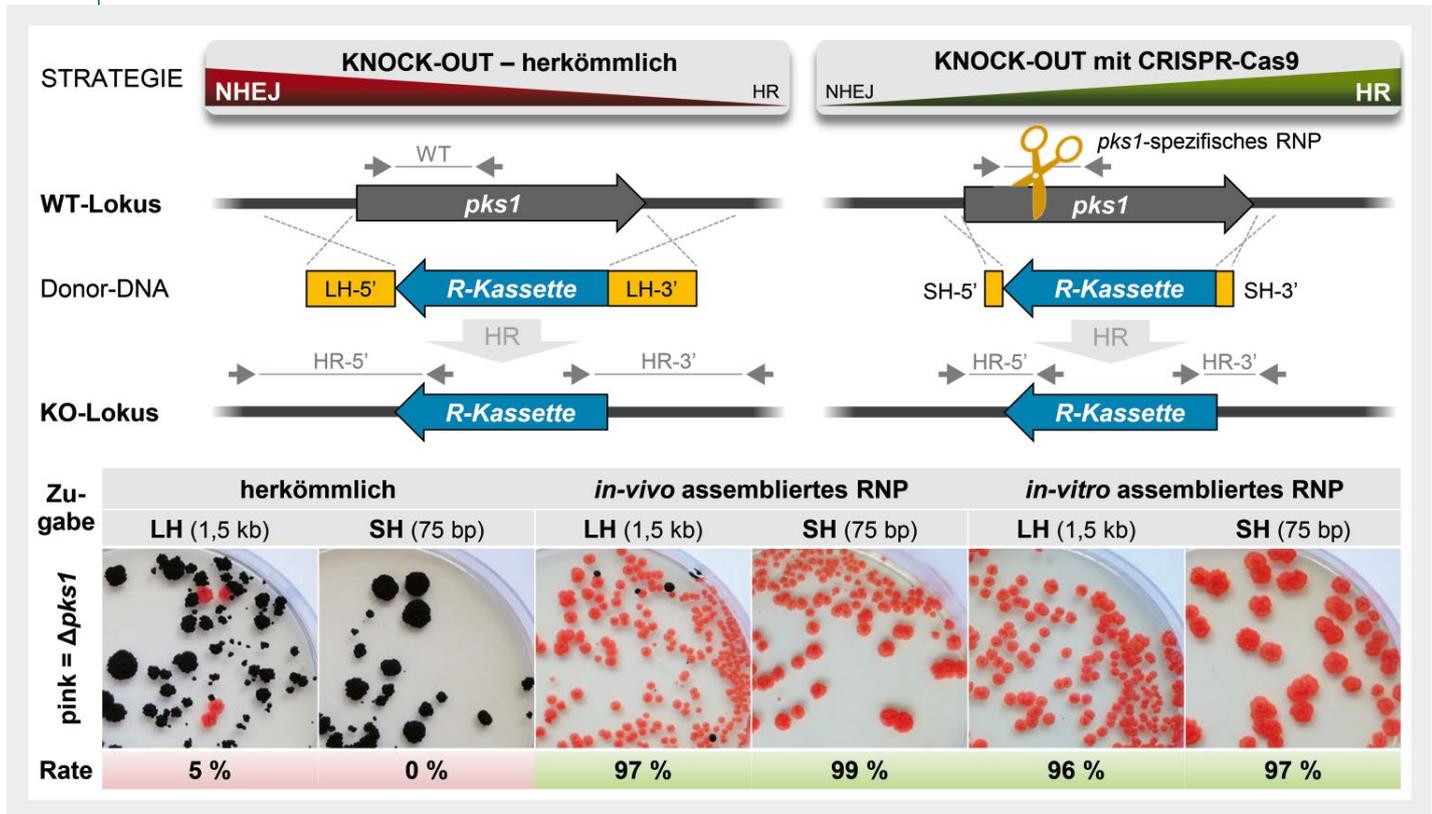
DSB erzeugt wird, fällt die HR-Rate höher aus. Ohne CRISPR-Cas9 wird die Donor-DNA überwiegend über den Reparaturmechanismus der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) ektopisch in das Genom integriert, wodurch zwar resistente Transformanten erhalten werden, aber das Zielgen weiterhin vorhanden ist. Für den herkömmlichen Ansatz werden lange homologe Sequenzen benötigt, die in einem Klonierungsvektor mit einer Resistenzkassette fusioniert werden müssen. Resistenzkassetten mit kurzen homologen Sequenzen können dagegen klonierungsfrei in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern mit 5'-Überhängen hergestellt werden. In der Tat waren beide CRISPR-Cas9-Strategien, *in-vitro*- vs. *in-vivo*-Assemblierung, gleichermaßen effizient im Zusammenspiel mit beiden Arten von Donor-DNA, da sie fast ausschließlich pinkfarbene, d. h. $\Delta pks1$ -Transformanten hervorbrachten. Demgegenüber stehen fünf Prozent und null Prozent für die herkömmliche Methode mit langen und kurzen homologen Sequenzen.

Mit beiden CRISPR-Cas9-Strategien konnten ferner durch die Transformation von Wildtyp-Protoplasten mit zwei sgRNAs für DSBs in *pks1* und *pbs1* und entsprechender Donor-DNA - d. h. zwei verschiedene Resistenzkasset-

ten flankiert von *pks1* bzw. *pbs1* Sequenzen - weiße Transformanten durch die gleichzeitige Deletion von *pks1* und *pbs1* erzeugt werden [15, 18]. Die Funktionalität beider Strategien, *in vitro* und *in vivo*, demonstriert ferner, dass Cas9 in beiden Fällen aufgrund der angehängten Kernlokalisierungssequenzen in den Zellkern von *K. petricola* gelangt und kurze homologe Sequenzen bereits ausreichend für maximale Geneditierungseffizienzen sind. Das Plasmid für die Expression von sgRNA und Cas9 hat nur eine kurze Halbwertszeit in *K. petricola* (keine Replikation), so dass es schon in den Transformanten nicht mehr nachweisbar ist. Das zeigt gleichzeitig, dass das Plasmid nicht in das Genom von *K. petricola* integriert, was zu schnell wachsenden Hygromycin-resistenten Transformanten führen würde.

K. petricola heute – ein gut gefüllter Werkzeugkasten für funktionale Analysen

Die Verfügbarkeit von gleich zwei Strategien für transientes CRISPR-Cas9 eröffnet Perspektiven, und die jeweils einfachere und kostengünstigere Strategie kann verfolgt werden. Die Verwendung von *in vitro* hergestellten RNPs ist zu bevorzugen, um Klonierungen zu umgehen. Die Nutzung von Plasmiden ist für häufig genutzte Zielgene

ABB. 7 | ENTFERNUNG VON ABSCHNITTEN AUS DEM GENOM VON *K. PETRICOLA* (KNOCK-OUT)


Herkömmlicher Ansatz und CRISPR-Cas9-assistierte Ansätze unter Verwendung von Donor-DNA mit langen (LH = long homologous) und kurzen homologen (SH = short homologous) Sequenzen für den Knock-out (KO) von *pks1*. Infolge eines Doppelstrangbruchs in *pks1* – zufällig oder durch ein *pks1*-spezifisches RNP hervorgerufen – wird *pks1* aufgrund einer homologen Rekombination (HR) gegen die Resistenzkassette (R-Kassette) ausgetauscht. Primerpaare für den Nachweis des KO (HR-5' und HR-3') und die Abwesenheit des Zielgens (WT) sind als graue Pfeile eingezeichnet. Angegeben sind die KO-Raten (pinke Kolonien/alle Kolonien). NHEJ (englisch: non-homologous end-joining): nicht-homologe Endverknüpfung. Nach [15].

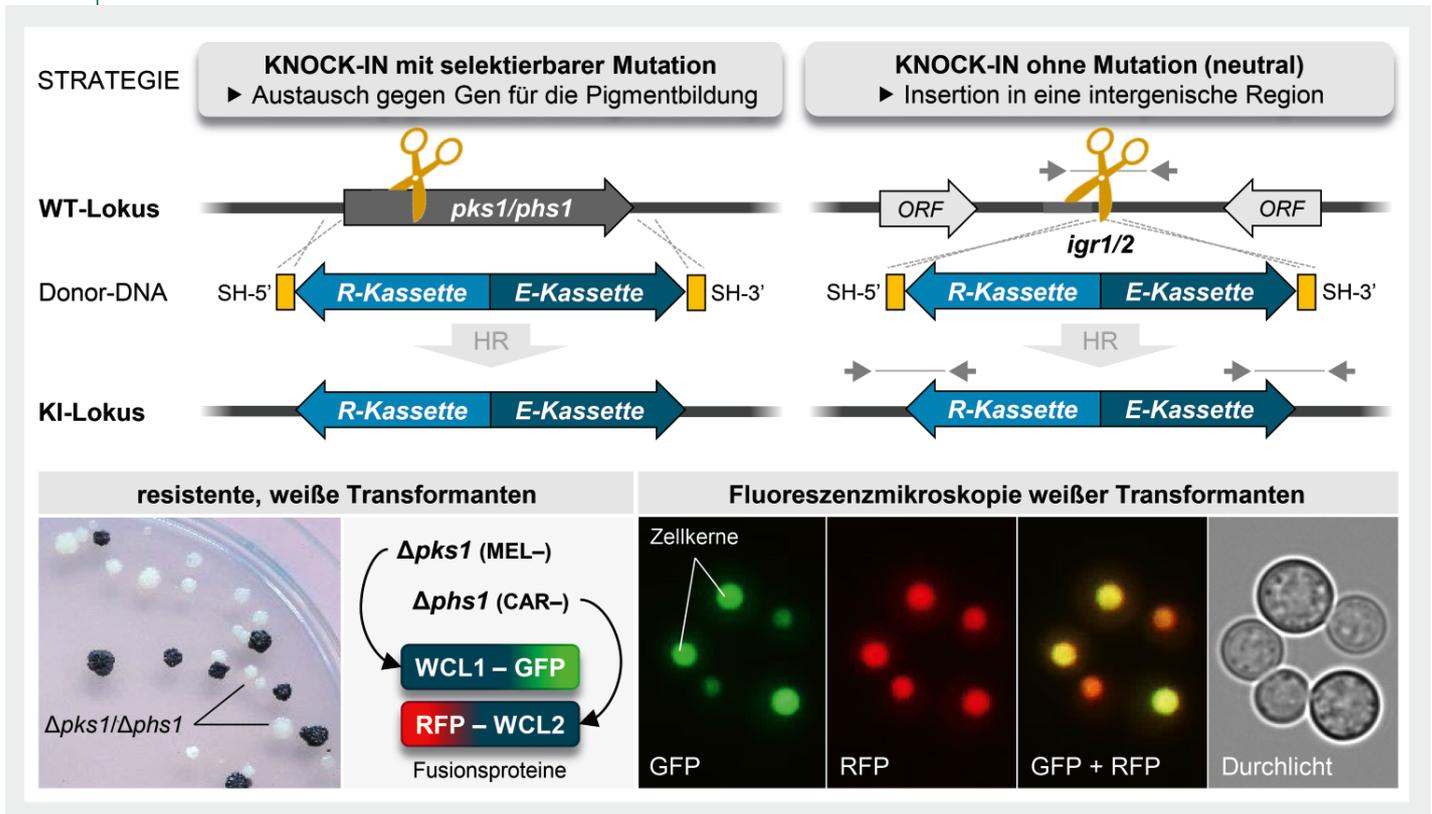
vorteilhaft, weil Plasmid-DNA kostengünstig hergestellt und einfach gelagert werden kann. Ferner ermöglicht die Expression von zwei oder mehreren sgrNAs von einem Plasmid die gleichzeitige Editierung verschiedener Stellen im Genom (*multiplexing*). Dafür wurden weitere Selektionssysteme implementiert, so dass insgesamt fünf Resistenzkassetten für *K. petricola* zur Verfügung stehen.

Im Zuge unserer Arbeiten konnten wir die Strategien für die gleichzeitige Mutation mehrerer Gene durch die Anpassung der Donor-DNA steigern. Die Zugabe eines synthetisierten einzelsträngigen DNA-Oligonukleotids, zusammengesetzt aus je 50 Nukleotiden einer homologen Sequenz zu den 5' und 3' nichtkodierenden Bereichen des Zielgens, reicht für die HR aus. Als Folge wird der kodierende Bereich des Zielgens entfernt. Über die Expression mehrerer, zielgerichteter Cas9 von einem Plasmid und die Zugabe einer Donor-DNA mit einer Resistenzkassette sowie DNA-Oligonukleotiden für alle weiteren Gene (entsprechend der zugegebenen sgrNAs) können mehrere Gene deletiert werden. Bisher wurden mit dieser Strategie vier Gene in einem Schritt ausgeschaltet, in einer zweiten Runde wurden in der Vierfachmutante weitere vier Gene

ausgeschaltet, wodurch die ersten *K. petricola*-Stämme mit acht KOs vorliegen.

Neben der Ausschaltung von Genen für die Identifizierung ihrer Funktionen im Organismus ist die Genexpression eine weitere wichtige Methode. So kann über die Expression eines fluoreszierenden Fusionsproteins die Lokalisierung eines Genprodukts ermittelt werden. Ferner kann getestet werden, ob unveränderte/veränderte Gene oder Gene aus anderen Organismen funktional sind. Herkömmlich wurden – wegen unzureichender HR-Raten in den meisten Pilzen – Expressionskonstrukte bestehend aus Resistenz- und Expressionskassette durch ektopische Integration in die Genome eingebracht. Dieses ermöglichte in vielen Fällen die Expression des gewünschten Gens, aber je nach Integrationsort im Genom konnten die Gene unterschiedlich stark exprimiert werden. Im schlimmsten Fall erfolgte die Integration in einen kodierenden Bereich und führte damit zur Unterbrechung eines Gens. Unter Verwendung der CRISPR-Cas9-Technologie können nun Expressionskonstrukte gezielt in das Genom inseriert werden, womit genetisch identische Transformanten erzeugt werden und vergleichende Expressionsstudien vereinfacht

ABB. 8 | GEZIELTE INSERTION VON KONSTRUKTEN IN DAS GENOM VON *K. PETRICOLA* (KNOCK-IN)



Oben: Expressionskassetten (E-Kassette) mit fremden oder eigenen Genen können in unterschiedlicher Weise in das Genom von *K. petricola* inseriert werden. Unten: Schwarz-Weiß-Selektion von Transformanten für die Lokalisierung von zwei kernlokalisierten Proteinen (WCL1, WCL2) durch die Fusion mit GFP oder RFP. Da nur der Austausch beider Pigmentgene gegen die Expressionskonstrukte zu weißen Transformanten führt, können diese direkt für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. KI: Knock-in. Nach [18].

werden. Für *K. petricola* stehen verschiedene Möglichkeiten für den Knock-in (KI) von Expressionskonstrukten zur Verfügung (Abbildung 8). Der Austausch eines Pigmentgens (*pks1* → Schwarz-Pink-Selektion) oder beider Pigmentgene (*pks1 + phs1* → Schwarz-Weiß-Selektion) im Wildstamm ermöglicht die Detektion erfolgreicher Integrationsereignisse aufgrund einer veränderten Pigmentierung und ist vorteilhaft für Lokalisierungs- oder Promoterstudien, für die oftmals viele verschiedene Konstrukte untersucht werden müssen. Für die neutrale Insertion in das Genom, d. h. ohne dass andere Gene beeinträchtigt werden, wurden verschiedene intergenische Regionen experimentell als geeignete Insertionsstellen validiert. Die Insertion selbst führt nachweislich zu keinem veränderten Phänotyp, da keine Sequenzen entfernt oder unterbrochen werden, so dass mögliche Phänotypen der Expressionsstämme nur auf den inserierten Genen beruhen [18]. Unter Nutzung eines Plasmids für die Expression von Cas9 und mehrerer sgRNAs und entsprechenden Donor-DNAs (ggf. auch ohne Resistenzkassette) können ebenfalls gleichzeitig mehrere Expressionskonstrukte in das Genom von *K. petricola* eingeführt werden. Ferner ist es durch Nutzung des viralen 2A-Peptids und des synthetischen Tet-On-

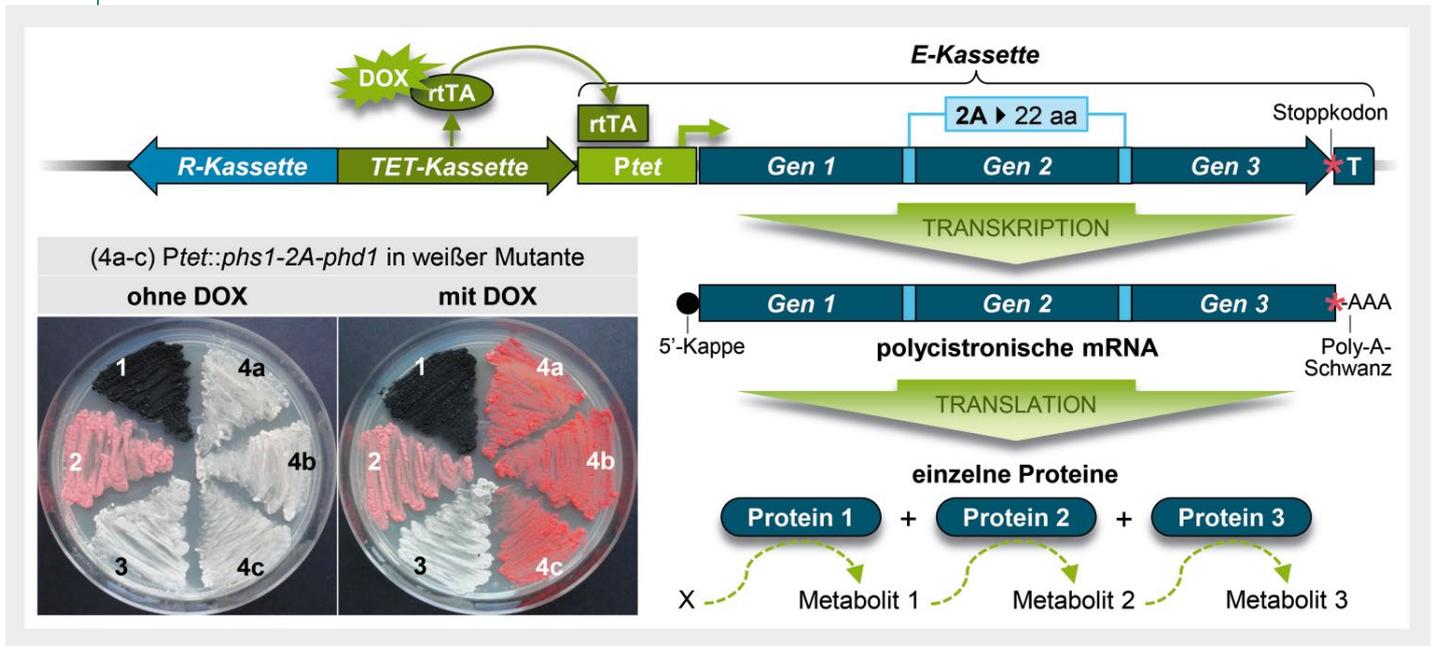
Regulationssystems möglich, mehrere Gene von einem Konstrukt in einem Genlokus kontrolliert durch Zugabe des Induktors Doxycyclin zu exprimieren [19] (Abbildung 9).

Die Zukunft – vom Stein auf (neue) Materialien, in den Fermenter oder ins All?

Mit den genannten Techniken ist es möglich, das Genom von *K. petricola* gezielt zu editieren, um Fragestellungen der Biologie der gesteinsbesiedelnden Pilze, der Biofilmbildung in urbanen Räumen, der CO₂-bindenden Technologien wie Gesteinsverwitterung und der Schädigung von Materialien zu adressieren. Dazu können Modellbiofilme, die *K. petricola* und Cyanobakterien und/oder Grünalgen in unterschiedlichen Anteilen enthalten, genutzt werden. Mit Hilfe des *K. petricola*-Modells können auch Fragen zu den bislang wenig erforschten verwandten humanpathogenen schwarzen Pilzen beantwortet werden.

Gleichzeitig machen die vorhandenen Techniken sowie seine intrinsischen Eigenschaften *K. petricola* zu einem geeigneten eukaryotischen Expressionssystem für die Produktion von Sekundärmetaboliten und (sekretier-

ABB. 9 | REGULIERBARE EXPRESSION VON EINEM ODER MEHREREN GENEN IN *K. PETRICOLA*



Das Tet-On-System enthält zwei Komponenten: eine Kassette für die stetige Expression des Transaktivators rTA (TET) und einen rTA-abhängigen Promoter (Ptet). rTA verändert durch die Bindung von Doxycyclin (DOX) seine Konformation und aktiviert Ptet, wodurch das stromabwärts gelegene Gen transkribiert wird. Durch das virale 2A-Motiv können zwei oder mehr Gene fusioniert werden. Links unten: ein Beispiel für die Nutzung der Technik in *K. petricola*. Ein Tet-On-Konstrukt für die Carotinoid-Gene *phs1* und *phd1* wurde in eine weiße Mutante (3 – $\Delta pks1/\Delta phs1-phd1$) eingebracht. Die entstandenen Stämme (4a-c) überproduzieren Carotinoide bei Zugabe des Induktors DOX. 1: Wildtyp, 2: $\Delta pks1$. T: Terminator. Abb. nach [19].

ten) Proteinen. Durch den Austausch der Pigmentgene gegen Expressionskonstrukte entstehen weiße, einzeln wachsende Hefezellen, die Acetyl-CoA akkumulieren, das für andere Synthesen genutzt werden kann. Darüber hinaus besitzt der Pilz keine Gene für die Bildung weiterer unerwünschter Sekundärmetabolite oder sekretierter zellwandabbauender Enzyme, kann aber im Gegensatz zu der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* die Belastung durch konstitutive Sekundärmetabolitsynthese und Proteinsekretion tragen.

Außerdem sind die gewonnenen Erfahrungen und Protokolle nützlich für die Etablierung der gezielten Genomeditierung in anderen, bisher schwer zugänglichen Pilzen. In unserem Labor haben wir die Herausforderung angenommen, den womöglich stresstolerantesten eukaryotischen Organismus, *Cryomyces antarcticus*, genetisch zu manipulieren. *C. antarcticus* besiedelt Steine in der Antarktis und ist an niedrige Temperaturen und starke UV-Strahlung angepasst [20]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird er seit langem als Testorganismus in der astrobiologischen Forschung verwendet, um die Grenzen des Lebens unter extremen (Mars-ähnlichen) Bedingungen zu untersuchen [21]. Der Pilz wächst außerordentlich langsam – ausschließlich durch meristematische Zellteilungen –, so dass die Bildung einer Kolonie von der Größe eines Stecknadelkopfs mehr als einen Monat dauert. Folglich benötigt die Prozedur von der Produktion von Bio-

masse für die Herstellung von Protoplasten bis hin zur genotypischen Analyse 9–10 Monate. Schließlich konnten nichtmelanierte Mutanten erzeugt werden, die nun für funktionelle Untersuchungen verwendet werden [22]. Damit wurde einmal mehr die Bedeutung der CRISPR-Cas9-Technologie in Pilzen demonstriert. Denn das Genom von *C. antarcticus* enthält überwiegend Gene in zwei Kopien, wobei bis heute nicht geklärt ist, ob das Genom diploid oder aneuploid aufgrund einer Genduplikation und sukzessiven Genverlusts ist.

Zusammenfassung

Gesteinsbesiedelnde schwarze Pilze sind an das raue Leben auf Steinen in Wüsten angepasst und setzen Mineralien aus den Gesteinen frei. Die gleichen Anpassungen befähigen diese Pilze menschengeschaffene Oberflächen wie Denkmäler, Gebäudefassaden und Solaranlagen zu besiedeln. Dabei sind die schwarzen Pilze oft mit phototrophen Mikroorganismen vergesellschaftet. Das langsame Wachstum und die melanisierten Zellwände, die die Pilze vor extremen Umwelteinflüssen schützen, erschweren molekularbiologische und gentechnische Verfahren, wodurch bisher kaum etwas über die Biologie dieser Pilze bekannt ist. Der Vertreter *Knufia petricola* wurde ausgewählt, um mithilfe adaptierter Methoden wie der CRISPR-Cas9-vermittelten Genomeditierung, die Prozesse der Materialbesiedlung und -schädigung zu verstehen.

Summary

CRISPR-Cas9 in material research

Rock-inhabiting black fungi are adapted to the harsh life on rocks in deserts and release minerals from the rocks. The same adaptations enable these fungi to colonize man-made surfaces such as monuments, building facades and solar systems. Black fungi are often associated with phototrophic microorganisms. The slow growth and the melanized cell walls, which protect the fungi from extreme environmental influences, render molecular biological and genetic engineering methods difficult, which is why little is known about the biology of these fungi. *Knufia petricola* was selected to understand the processes of material colonization and damage with the help of adapted methods such as CRISPR-Cas9-mediated genome editing.

Danksagung

Großer Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitenden in der *Knufia*-Forschungsgruppe für ihre Arbeit. Besonders wichtig waren die genetischen Experimente von Steffi Noack-Schönmann, Oliver Voigt und Nicole Knabe – sie haben den Weg für die Nutzung von CRISPR-Cas9 in *K. petricola* geebnet. Alles wurde nur möglich durch die Vision von Anna A. Gorbushina, eines Tages *K. petricola* als ein Modell in der Materialforschung zu nutzen. Ferner dankt die Autorin der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) für die finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Schlagworte:

Knufia petricola, schwarze Pilze, Biofilme, Pigmente, Genomeditierung, *multiplexing*, Resistenzkassette, Transformatanten

Literatur

- [1] M. Schuster, R. Kahmann (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genet Biol* 130, 43–53.
- [2] A. A. Gorbushina (2007). Life on the rocks. *Environ Microbiol* 9, 1613–1631.
- [3] D. Tesei (2022). Black fungi research: out-of-this-world implications. *Encyclopedia* 2, 212–229.
- [4] T. D. W. Corbett et al. (2024). Organic carbon source controlled microbial olivine dissolution in small-scale flow-through bioreactors, for CO₂ removal. *npj Mater Degrad* 8, 34.
- [5] R. Gerrits et al. (2020). How the rock-inhabiting fungus *K. petricola* A95 enhances olivine dissolution through attachment. *Geochim Cosmochim Acta* 282, 76–97.
- [6] L. Selbmann et al. (2020). Shed light in The daRk lineages of the fungal tree of life - STRES. *Life* 10.
- [7] A. A. Gorbushina et al. (1993). Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiol J* 11, 205–221.
- [8] U. Wollenzien et al. (1995). On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Sci Total Environ* 167, 287–294.
- [9] U. Wollenzien et al. (1997). *Sarcinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 281–288.
- [10] L. Selbmann et al. (2021). Culture-dependent and amplicon sequencing approaches reveal diversity and distribution of black fungi in Antarctic cryptoendolithic communities. *J Fungi (Basel)* 7.

- [11] R. Breitenbach et al. (2022). The role of extracellular polymeric substances of fungal biofilms in mineral attachment and weathering. *npj Mater Degrad* 6, 42.
- [12] K. Flieger et al. (2018). Development of an improved carotenoid extraction method to characterize the carotenoid composition under oxidative stress and cold temperature in the rock-inhabiting fungus *Knufia petricola* A95. *J Fungi* 4, 124.
- [13] J. Schumacher, A. A. Gorbushina (2020). Light sensing in plant- and rock-associated black fungi. *Fungal Biol* 124, 407–417.
- [14] S. Noack-Schönmann et al. (2014). Genetic transformation of *Knufia petricola* A95 – a model organism for biofilm-material interactions. *AMB Express* 4, 80.
- [15] O. Voigt et al. (2020). An advanced genetic toolkit for exploring the biology of the rock-inhabiting black fungus *Knufia petricola*. *Sci Rep* 10, 22021.
- [16] C. S. Nødvig et al. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One* 10, e0133085.
- [17] C. S. Nødvig et al. (2018). Efficient oligo nucleotide mediated CRISPR-Cas9 gene editing in *Aspergilli*. *Fungal Genet Biol* 115, 78–89.
- [18] E. A. Erdmann et al. (2022). Genetic engineering of the rock-inhabitant *Knufia petricola* provides insight into the biology of extremotolerant black fungi. *Front Fungal Biol* 3, 862429.
- [19] E. A. Erdmann et al. (2024). The Tet-on system for controllable gene expression in the rock-inhabiting black fungus *Knufia petricola*. *Extremophiles* 28, 38.
- [20] L. Selbmann et al. (2005). Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Stud Mycol* 51, 1–32.
- [21] S. Onofri et al. (2020) The amazing journey of *Cryomyces antarcticus* from Antarctica to space. In *Extremophiles as astrobiological models* (Seckbach, J. et al., eds). pp. 237–254, Wiley.
- [22] I. Catanzaro et al. (2024). Deletion of the polyketide synthase-encoding gene *pks1* prevents melanization in the extremophilic fungus *Cryomyces antarcticus*. *IUBMB Life*, <https://doi.org/10.1002/iub.2895>.

Verfasst von:



Julia Schumacher studierte Biologie, wurde 2008 promoviert und habilitierte sich 2017 – alles an der Universität Münster. Seit 2018 ist sie als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Material und Umwelt der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) in Berlin tätig und lehrt seit 2021 als Privatdozentin an der Freien Universität Berlin. Sie forscht zu verschiedenen Aspekten der molekularen Mykologie wie der Bedeutung von Licht für Pilze, die mit phototrophen Organismen assoziiert sind.

Korrespondenz

PD Dr. Julia Schumacher
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
Abteilung 4 Material und Umwelt
Unter den Eichen 87
12205 Berlin
E-Mail: Julia.Schumacher@bam.de



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“.
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie.



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

