

Untersuchungen zur DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in somatischen Pflanzenzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Michael Pacher

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse
Referent: Prof. Dr. Holger Puchta
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper
Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2008

für Sylvia

Danksagung

An allererster Stelle und besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn *Prof. Dr. Holger Puchta* bedanken – für die Möglichkeit und die Mittel, diese Arbeit anfertigen zu können, für das in mich gesetzte Vertrauen und insbesondere für die sehr persönliche Betreuung dieser Arbeit und die zahlreichen Diskussionen, die mich lehrten, kritisch mit allen Ergebnissen umzugehen. Außerdem möchte ich mich für die zahlreichen Möglichkeiten bedanken, unsere Forschung im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit an Schulen oder in Workshops zu vermitteln und zahlreichen Praktikanten nahe bringen zu dürfen. Des Weiteren gab er mir die Chance, auf verschiedenen Tagungen im In- und Ausland unsere Arbeit zu präsentieren. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für die Möglichkeit bedanken, die Instituts-Homepage neu gestalten und pflegen zu dürfen. Auch dadurch habe ich Vieles gelernt. *Lieber Holger – vielen herzlichen Dank!*

Herrn *Prof. Dr. Jörg Kämper* danke ich sehr für seine Bereitschaft, die Begutachtung dieser Arbeit als Korreferent zu übernehmen.

Herrn *Dr. Manfred Focke* gilt mein herzlicher Dank nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern auch für zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen, die für mich immer von hohem Wert waren. Zudem gebührt ihm ein ganz besonderer Dank: durch seine begeisternden Ausführungen über die Besonderheiten der Pflanzenbiochemie und seinen Enthusiasmus, Neues auszuprobieren, hat er mich für „die Botanik II“ gewonnen. Als meine Begeisterung für Pflanzen feststand, war ich zur passenden Zeit an der richtigen Stelle: *Holger Puchta* übernahm den Lehrstuhl Botanik II und brachte damit die moderne Pflanzengenetik nach Karlsruhe. *Vielen Dank, Manfred!*

Frau *Dr. Waltraud Schmidt-Puchta* möchte ich ebenfalls meinen herzlichen Dank aussprechen. Sie hat mich mit einer bewundernswerten Geduld in die Anfänge des „Chromosomen-Translokations-Projektes“ eingeführt und war stets bereit, meine Fragen zu beantworten. *Vielen herzlichen Dank!*

Ein ganz besonders tief empfundener Dank gilt Frau *Maren Nitze* für ihre technische Unterstützung dieser Arbeit und ihre konstruktive Kritik sowie zahlreiche Anregungen. *Maren, ich kann Dir gar nicht genug danken! Ohne Dich wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Ich danke Dir!*

DANKSAGUNG

Bei Frau *Dipl.-Biol. Nadine Roth* möchte ich mich herzlich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der molekulargenetischen Charakterisierung der NHEJ-Reporterlinien und ihr „Fingerspitzengefühl“ beim Kreuzen zahlreicher *Arabidopsis*-Pflanzen bedanken – und für die Korrektur des Manuskriptes dieser Arbeit. *Nadine – vielen, vielen Dank für Alles!!*

Frau *Susanne Müller* und Frau *Dipl.-Biol. Olga Sosedova* gebührt ebenfalls mein Dank für ihr Engagement bei der Etablierung des „NHEJ-Assay-Systems“.

Nicht unerwähnt bleiben soll eine meiner fleißigsten Projektstudentinnen – Frau *Katharina Svyatyna* – sie hat mit ihrer wissenschaftlichen Neugier und ihrem beeindruckenden Einsatz ebenfalls das „NHEJ-Projekt“ vorangebracht. Bei nächtelangen Internet-Recherchen entdeckte sie das „SiteFinder-Protokoll“ zur Insertions-Bestimmung von Transgenen und etablierte diese Technik in unserem Labor, wo sie inzwischen ständig und mit Erfolg angewandt wird und auch Eingang in diese Arbeit fand. *Vielen Dank, Katha!*

Allen namentlich nicht genannten *Mitarbeitern der Botanik II* möchte ich an dieser Stelle für die tolle Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung auf die eine oder andere Weise danken.

Ebenfalls danken möchte ich Frau *PD Dr. Natalia Requena* für die Überlassung der hypervirulenten AGL-1 Agrobakterien.

Ein ganz besonderer Dank gilt dem Personal des Botanischen Gartens für die effiziente und arbeitsintensive Anzucht zahlreicher transgener *Arabidopsis*- und Tabak-Linien. Meinen herzlichen Dank für die gute Versorgung meiner „Tabak-Felder“ möchte ich Frau *Angelika Piernitzki*, Frau *Karin Dietze*, Herrn *Joachim Daumann*, Frau *Stefanie Zimmerer* und Herrn *Siegfried Bendel* aussprechen. Auch die *Arabidopsis*-Pflanzen wurden stets aufs Beste versorgt durch Herrn *Karlheinz Knoch*, Frau *Waldtraud Wehrle* und Herrn *Kevin Malakowsky*.

Meinen Eltern danke ich von ganzen Herzen für die jahrelange Unterstützung während meines Biologiestudiums und den Glauben an mich. *Ich danke euch!!!* Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Großmutter für ihr Interesse an meiner Arbeit und an meinem Vorankommen sowie für ihre stetige Motivation.

Zuletzt möchte ich einem ganz besonderen Menschen danken – meiner Freundin *Sylvia* – für den notwendigen Rückhalt, die ermutigenden Worte in schwierigen Zeiten während dieser Arbeit, ihr Verständnis für arbeitsreiche Wochenenden, die hochwertige kulinarische „Versorgung“ während all der Jahre – und ganz besonders für ihr Liebe. *Sylvia, ich danke Dir sehr!*

Teile der vorliegenden Dissertation sind in folgende Publikation eingegangen:

Michael Pacher, Waltraud Schmidt-Puchta and Holger Puchta (2006). Two unlinked double-strand breaks can induce reciprocal exchanges in plant genomes via homologous recombination and nonhomologous end joining. *Genetics* **175**: 21-29

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Doppelstrangbrüche – Reparatur durch Rekombination	2
1.2	Homologe Rekombination	5
1.2.1	Modelle zur Beschreibung der homologen Rekombination	6
1.3	Non-Homologous End-Joining (NHEJ)	11
1.3.1	Allgemeiner Ablauf des Non-Homologous End-Joining	11
1.4	Untersuchungen zur DSBR in höheren Pflanzen	13
1.4.1	Extrachromosomale Rekombination	13
1.4.1.1	Extrachromosomale homologe Rekombination	13
1.4.1.2	Extrachromosomales NHEJ	15
1.4.2	Limitierende Faktoren bei der Untersuchung extrachromosomaler Rekombination	16
1.4.3	Erzeugung von Doppelstrangbrüchen im Pflanzengenom	16
1.4.4	Intrachromosomale Rekombination	16
1.4.4.1	Induktion ortsspezifischer DSBs im Pflanzengenom	17
1.4.4.2	Die Homing Endonuklease I-SceI	18
1.4.5	DSBR mittels homologer Rekombination in somatischen Pflanzenzellen	19
1.4.5.1	Ektopische homologe Rekombination	20
1.4.5.2	Allelische homologe Rekombination	22
1.4.5.3	Intrachromosomale homologe Rekombination	22
1.4.6	DSB-Reparatur durch Non-Homologous End-Joining	26
1.5	Ziele der vorliegenden Arbeit	31
2	Material und Methoden	32
2.1	Chemikalien	32
2.2	Lösungen und Puffer	33
2.2.1	DNA-Isolierung	33
2.2.2	Histochemische Färbung	34
2.2.3	Southern Blotting	34
2.3	Enzyme	35
2.3.1	DNA-Polymerasen	35
2.3.2	Restriktionsenzyme	36

2.3.3	Nukleasen, Ligasen	36
2.4	Plasmide	36
2.5	Primer	36
2.6	Medien	37
2.6.1	Bakterienkultur	37
2.6.2	Pflanzenanzucht	37
2.6.3	Pflanzen-Transformation	39
2.7	Kits und Verbrauchsmaterial	39
2.8	Geräte und Apparaturen	39
2.8.1	Southern Blotting	39
2.8.2	Pflanzenanzucht	40
2.9	Spezielle Software	40
2.10	Versuchsorganismen	40
2.10.1	Pflanzen	40
2.10.2	Bakterienstämme	40
2.11	Mikrobiologische Arbeiten	40
2.11.1	Transformation und Kultur von <i>E. coli</i>	40
2.11.2	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
2.12	Pflanzen-Anzucht	41
2.12.1	Lagerung von Saatgut	41
2.12.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	41
2.12.3	<i>Nicotiana tabacum</i>	42
2.12.4	Kreuzungen	42
2.13	Pflanzen-Transformation	43
2.13.1	<i>Arabidopsis</i> -Transformation	43
2.13.2	Tabak-Transformation	43
2.14	Molekularbiologische Arbeiten	44
2.14.1	PCR und Klonierungen	44
2.14.2	Klonierung des Vektors pNHEJ	44
2.14.3	Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM [®] -T Vektor	45
2.14.4	Sequenzierungen	45
2.14.5	DNA-Schnellpräparation aus Pflanzen	45
2.14.6	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen	45

2.14.7	Histochemische Färbung	46
2.14.7.1	Berechnung des Induktionsfaktors	46
2.14.8	Southern Blot-Analysen	46
2.14.8.1	Restriktionsspaltung	46
2.14.8.2	Blotting	47
2.14.8.3	Herstellung und Markierung der DNA-Sonden	48
2.14.8.4	Hybridisierung	48
2.14.8.5	Detektion	49
2.14.9	Bestimmung der T-DNA-Insertions-Loci der NHEJ-Linien	49
2.14.10	Bestimmung der RB-Flanken der NHEJ-Linien	53
2.14.11	Charakterisierung der T-DNA-Insertions-Loci der NHEJ-Linien	53
2.14.12	PCR-basierte Genotypisierung von NHEJ-Linien	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Induktion reziproker Translokationen im Tabak-Genom	55
3.1.1	Konzept des experimentellen Systems	55
3.1.2	Etablierung des experimentellen Systems	58
3.1.3	Induktion der Doppelstrangbrüche durch I-SceI	58
3.1.4	Selektion auf chromosomale Translokationen	60
3.1.5	PCR-Analyse der rekombinanten Kopplungen	60
3.1.6	Vererbung der neuen Kopplungen	64
3.1.7	Southern Blot-Analyse	66
3.2	Etablierung eines neuartigen Systems zur <i>in vivo</i> Quantifizierung NHEJ-vermittelter DSBR in <i>Arabidopsis</i>	69
3.2.1	Konzept des experimentellen Systems	69
3.2.2	Etablierung des experimentellen Systems	70
3.2.3	Charakterisierung des Assay-Systems	71
3.2.4	Analyse von rekombinanten Verknüpfungen	77
4	Diskussion	82
4.1	Reparatur von zwei simultanen DSBs im Genom somatischer Zellen von Tabak	82
4.1.1	Analyse von Translokations-Ereignissen	82

4.1.2	Reziproke Translokationen im Tabak-Genom	84
4.1.3	Limitierungen des experimentellen Systems	86
4.1.4	Bedeutung von Translokations-Ereignissen für die Genom-Evolution	88
4.1.5	Vergleich mit Untersuchungen bei anderen Spezies	89
4.1.6	Mögliche biotechnologische Anwendungen	90
4.2	Etablierung eines neuartigen Systems zur <i>in vivo</i> Quantifizierung von NHEJ-Ereignissen in <i>Arabidopsis</i>	93
4.2.1	Ein neuer Ansatz zur Analyse der DSB-Reparatur <i>in planta</i>	94
4.2.2	Ansätze zur Untersuchung der DSBR-Wege in anderen Organismen	98
4.2.3	DSB-Reparatur durch NHEJ in <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
4.2.4	Ausblick: zukünftige Anwendungen des neuen Systems in <i>Arabidopsis</i>	104
5	Zusammenfassung	108
6	Summary	110
7	Literatur	112
8	Anhang	133

II **Abbildungsverzeichnis**

1.1	Ursachen für Doppelstrangbrüche (DSBs)	3
1.2	Homologe Sequenzen	6
1.3	Das DSBR-Modell der homologen Rekombination	7
1.4	Das Synthesis-Dependent Strand-Annealing (SDSA)-Modell	8
1.5	Das Single-Strand Annealing (SSA)-Modell	9
1.6	Break-induced Replication (BIR)	10
1.7	Verschiedene Verknüpfungsarten beim Non-Homologous End-Joining	12
1.8	Die Homing-Endonuklease I-SceI	18
1.9	Herkunft von "Filler"-DNA bei der DSB-Reparatur durch NHEJ	28
2.1	Sonden für Southern Blot Detektion	49
2.2	SiteFinder-Primer	50
2.3	Prinzip der SiteFinder-Reaktion	52
2.4	Prinzip des PCR-Screenings von NHEJ-Linien	54
3.1	I-SceI-vermittelte Induktion einer reziproken Translokation im Genom von <i>Nicotiana tabacum</i>	55
3.2	Experimentelles System zur Untersuchung I-SceI-induzierter reziproker Translokationen im Tabak-Genom	56
3.3	Induktion der Doppelstrangbrüche durch I-SceI	59
3.4	Nachweis der rekombinanten Kopplung A—D	60
3.5	Nachweis der rekombinanten Kopplung C—B	62
3.6	Sequenz-Analyse der rekombinanten Kopplungen C—B	63
3.7	Southern Blot Analyse zum Nachweis der rekombinanten Kopplungen	67
3.8	Konzept des experimentellen Systems zur <i>in vivo</i> Quantifizierung von NHEJ-Ereignissen	70
3.9	Identifizierung von Linien mit einer vollständigen Kopie der NHEJ-T-DNA	72
3.10	Southern Blot-Analyse zur Identifizierung von „single copy“ NHEJ-Linien	73
3.11	Nachweis der Funktionalität der I-SceI-Schnittstellen	74
3.12	Bestimmung der T-DNA-Insertions-Loci der NHEJ-Linien	75
3.13	Kreuzungen zur Charakterisierung der NHEJ-Linien	76
3.14	Sequenz-Analyse von NHEJ-vermittelten Rekombinations-Ereignissen	79

4.1	DSB-Reparatur durch einen SSA-ähnlichen Mechanismus	96
4.2	Enzymatischer Ablauf des NHEJ	101
4.3	Analyse von DSBR-Mutanten mit Hilfe des neu etablierten NHEJ- Assay-Systems	105

III Tabellenverzeichnis

2.1	Plasmide	36
2.2	Medienzusätze	38
2.3	Primerkombinationen und PCR-Protokolle zur Bestimmung der die RB flankierenden Genomsequenzen in den NHEJ-Linien	53
2.4	Genotypisierung von T-DNA-Insertions-Linien	54
3.1	Nachweis der rekombinanten Kopplung A—D	61
3.2	Segregation des rekombinanten Phänotyps Kanamycin-Resistenz	65
3.3	Auswertung der histochemischen Färbung	77
4.1	Die zentralen Proteine des NHEJ von Hefe, Vertebraten und <i>Arabidopsis</i>	102

IV Abkürzungsverzeichnis

<i>Ac</i>	<i>Activator</i> , autonom transponierendes genetisches Element
<i>Alu</i>	repetitive DNA-Sequenz, benannt nach dem Restriktionsenzym <i>AluI</i>
aRE	apparente Rekombinations-Ereignisse
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAP	Benzylaminopurin
<i>BAR</i>	PPT-Resistenzgen
BIR	Break-induced Replication
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel, SI-Einheit der Radioaktivität
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
B-Zellen	B-Lymphocyten, Leukocyten
<i>bz-R</i>	<i>bronze</i> Locus
C	Cefotaxim
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	copy DNA
Ci	Curie, alte Einheit für die Radioaktivität, $1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$
Col-0	<i>Arabidopsis</i> Ökotyp Columbia-0
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv	Kulturvarietät
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt-deionisiertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
D-loop	Displacement-loop, Heteroduplexstruktur
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Ds</i>	<i>Dissociation</i> , nicht-autonom transponierendes genetisches Element
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Double-Strand Break Repair, Doppelstrangbruch-Reparatur

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	embryonale Stammzellen
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm; Zentrifugalbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GFP	Green Fluorescent Protein, grün fluoreszierendes Protein
GM	Germination Medium
GOI	Gene of interest, Wunschgen
GSP	Genomspezifischer Primer
GUS	β -Glucuronidase (Reportergen)
HR	homologe Rekombination
Hygro	Hygromycin (Resistenzgen)
IF	Induktionsfaktor
kb	Kilobasen, 1000 Nukleotide
kV	Kilovolt
L.	Linné, Carl von
LB	Left Border
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
LTR	Long Terminal Repeat, 200-600 bp umfassende Sequenzwiederholung
KA	5'-Exon des Kanamycin-Resistenzgens
KAN	Kanamycin
KANA	Kanamycin-Resistenzgen
MBq	Megabecquerel, 10^6 Bq
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethansulfonsäure
MMR	Mismatch-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MS	Murashige & Skoog-Medium
MSH	Murashige & Skoog-Medium mit Hormonen
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Stichprobenumfang, Anzahl; Ploidiegrad
N	Nukleotid
NA	3'-Exon des Kanamycin-Resistenzgens

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NAA	Naphtyl acetic acid, Naphtylelessigsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
NHR	Nicht-homologe Rekombination
NPTII, <i>nptII</i>	Neomycin-Phosphotransferase II (Gen)
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame, offenes Leseraster
OSI	One-Sided Invasion
P	Promotor
<i>p.a.</i>	<i>pro analysis</i> , Qualitätsbezeichnung für Chemikalien
<i>P(A)</i>	Probability, Irrtumswahrscheinlichkeit von A
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
<i>P-Element</i>	Transposon in <i>Drosophila melanogaster</i>
<i>P-Gen/Locus</i>	Gen, welches in die Pigmentierung des Pericarps involviert ist
PEG	Polyethylenglykol
PhAR	Photosynthetic Active Radiation, photosynthetisch verwertbare Lichtmenge
PK	Proteinkinase
PNK	Polynukleotidkinase
PPT	Phosphinothricin (Herbizid)
RB	Right Border
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
rR	Repair Reporter, Reparatur-Reporter gen
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheiten, Sedimentationskoeffizient
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
SDSA	Synthesis-dependent Strand-Annealing
SFP	SiteFinder Primer
SIGnAL	SALK Institute Genome Analysis Laboratory
SSA	Single-Strand Annealing

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SSC	Sodium Saline Citrate
T	Terminator
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA
TIC	Ticarcillin
TIGR	The Institute for Genomic Research
TNT	Terminale Nukleotid Transferase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V	Vancomycin, Volt
WT	Wildtyp
X-GlcA	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid (auch: X-Gluc)

1 Einleitung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist Träger der Erbinformation aller lebenden Organismen (Sutton, 1903; Boveri, 1904). Auf Grund seiner chemischen Zusammensetzung ist dieses Molekül jedoch sehr reaktiv. Spontane Hydrolysen, Oxidationen und nicht-enzymatische Methylierungen können sich unter physiologischen Bedingungen ereignen (Lindahl, 1993). Neben diesen endogenen Ursachen können auch Faktoren exogenen Ursprungs die Erbinformation schädigen. Daher ist die Integrität der genetischen Information *ab initio* gefährdet (Bray & West, 2005).

Eine Vielzahl schädigender Faktoren führt zu einem umfangreichen Spektrum an DNA-Schäden. Die biologischen Konsequenzen dieser Schäden hängen dabei von der chemischen Natur des ursächlichen Faktors ab (Britt, 1999; Tuteja *et al.*, 2001). Ein DNA-schädigendes Agens kann mutagene oder cytotoxische Läsionen hervorrufen, wobei die Toxizität oder Mutagenität einer DNA-Schädigung von der Effizienz ihrer Beseitigung durch die betroffene Zelle abhängt (Britt, 1999). Um diesen Faktoren entgegenzuwirken, sind daher bereits früh im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt worden, welche die strukturelle und funktionelle Integrität der Erbinformation zu wahren helfen oder wieder herzustellen vermögen (Hoeijmakers, 2001). Man findet daher bei allen Organismen komplexe und oft hoch konservierte Signalwege, welche Schäden an der DNA erkennen und deren Reparatur einleiten (Kolodner *et al.*, 2002; Wyman & Kanaar, 2006).

Pflanzen sind auf Grund ihrer sessilen und photoautotrophen Lebensweise in besonderem Maße einer Vielzahl von Umweltfaktoren ausgesetzt, welche ihre Erbinformation beschädigen können. Eine weitere Besonderheit im Gegensatz zu anderen höheren Eukaryoten besteht darin, dass Pflanzen keine prädeterminierte Keimbahn besitzen. Undifferenzierte meristematische Zellen durchlaufen viele Zyklen der DNA-Replikation und Zellteilung, bevor aus einigen von ihnen Gameten entstehen. Somit können Mutationen in der Keimbahn fixiert und an die nächste Generation weitergegeben werden (McClintock, 1984; Walbot, 1985; Das *et al.*, 1990). Daher ist eine effiziente Beseitigung von DNA-Schäden bei Pflanzen einerseits von besonderer Bedeutung zur Wahrung der genetischen Stabilität, andererseits wird durch eine fehlerbehaftete Reparatur die Plastizität des

Pflanzengenoms und damit die Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umweltbedingungen erhöht. Im Gegensatz zu anderen Eukaryoten müssen sich bei Pflanzen Mutationen in somatischen Zellen zunächst auf zellulärer Ebene bewähren, bevor sie Eingang in die Keimbahn finden können (Walbot, 1985). Eine fehlerbehaftete Reparatur von DNA-Schäden stellt somit eine Triebkraft zur Genom-Evolution dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden spezifische Fragestellungen hinsichtlich der Mechanismen bearbeitet, mit welchen Pflanzen die gefährlichsten aller DNA-Schäden – *Doppelstrangbrüche* – reparieren. Aus diesem Grund wird auf eine Diskussion der ohne Zweifel essentiellen Wege zur Beseitigung anderer Schäden an der Erbinformation an dieser Stelle verzichtet. Viele der Erkenntnisse über die Mechanismen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und die daraus abgeleiteten Modelle basieren auf Studien in Prokaryoten und Hefen, daher sei darauf hingewiesen, dass die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Reparaturwege nicht als Pflanzen-spezifisch angesehen werden können. Vielmehr soll der gegenwärtige Kenntnisstand auf diesem Gebiet insoweit in verallgemeinerter Form aufgezeigt werden, um basierend darauf die bisher in diesem Bereich für Pflanzen gewonnenen Erkenntnisse einordnen zu können.

1.1 Doppelstrangbrüche – Reparatur durch Rekombination

Doppelstrangbrüche (DSBs) können durch verschiedene exogene und endogene Faktoren hervorgerufen werden (Abbildung 1.1). Einerseits stellen DSBs die gefährlichsten Beschädigungen der Erbinformation dar, da sie nicht nur lokal zu Mutationen führen können, sondern auch zu erheblichen Genomveränderungen, wie Verlust der Heterozygotie, Aneuploidie, Deletionen oder Translokationen. Da nur intakte Genome repliziert werden können, ist es von entscheidender Bedeutung für die strukturelle Integrität eines Genoms und das Überleben einer Zelle, dass DSBs effizient repariert werden. So wurde für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben, dass selbst ein einzelner DSB in einem nicht-essentiellen Gen lethal sein kann (Bennett *et al.*, 1993 & 1996). Auf der anderen Seite treten DSBs während der Meiose auch programmiert im Kerngenom von Eukaryonten auf (Übersicht in: Roeder, 1997). Erst diese induzierten Doppelstrangbrüche ermöglichen einen ungestörten Ablauf dieses Vorgangs. Zur Reparatur dieser Brüche werden Teile homologer Chromosomen neu

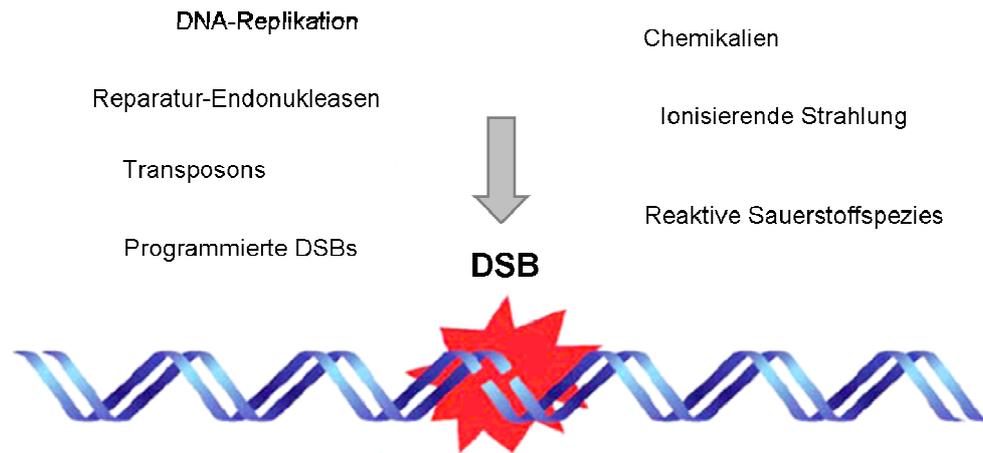


Abbildung 1.1: Ursachen für Doppelstrangbrüche (DSBs). Doppelstrangbrüche lassen sich sowohl auf endogene als auch exogene Faktoren zurück führen. Kollabierte Replikationsgabeln, Reparatur-Endonukleasen, Nebenprodukte des Metabolismus (wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies) oder die Transposition mobiler genetischer Elemente können als endogene Faktoren DSBs hervorrufen. Zudem treten während der Meiose programmierte DSBs auf, die für den korrekten Ablauf dieses Prozesses essentiell sind. Auch exogene Faktoren, wie Chemikalien oder ionisierende Strahlung können zu Doppelstrangbrüchen führen. Nach Bleuyard *et al.*, 2006 (verändert).

miteinander verknüpft. Diese Neuverknüpfung genetischer Information wird auch als *Rekombination* bezeichnet. Die Rekombination zwischen Allelen der parentalen Chromosomen in der Meiose ist die Grundlage für die genetische Diversität der Organismen (Shin *et al.*, 2004; Whitby, 2005). Auch die Entstehung variabler Regionen von leichten und schweren Ketten des Säugetier-Immunglobulins (Gellert, 2002; Roth, 2003) sowie der Paarungstypwechsel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind auf die gezielte Induktion von Doppelstrangbrüchen zurück zu führen (Haber, 1998).

Im Gegensatz zu allen anderen DNA-Schäden steht zur Reparatur von DSBs nicht der Komplementärstrang als Matrize für die Reparatur zur Verfügung. Zur Beseitigung dieser Brüche müssen DNA-Moleküle neu miteinander verknüpft werden. Grundsätzlich kennt man zwei Arten von Rekombinations-Prozessen, welche der Reparatur von Doppelstrangbrüchen in somatischen Zellen dienen (Leach, 1996).

Zum Einen können DNA-Moleküle im Bereich gleicher Sequenzabfolgen („Homologien“) verknüpft werden. Dieser Vorgang wird als „**homologe Rekombination**“ (HR) bezeichnet. Diese ist meistens konservativ, da nach dem Reparatur-Ereignis die Sequenz exakt der ursprünglich an dieser Stelle vorhandenen

Sequenz entspricht. Die biologische Bedeutung der homologen Rekombination in somatischen Zellen besteht darin, die genetische Information zu wahren und Mutationen zu verhindern. Die homologe Rekombination ist der Hauptweg zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen bei Bakterien und bei einzelligen Eukaryoten (Camerini-Otero & Hsieh, 1995; West, 1997; Mosig, 1998).

Die zweite Möglichkeit zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist nicht auf das Vorhandensein von Sequenz-Homologien angewiesen. Dieser Vorgang ist in der Regel mutagen, da sich nach der Verknüpfung der DNA-Enden die Sequenz von der ursprünglichen unterscheidet. Diese „nicht-homologe Rekombination“ (NHR) wird daher der HR als nicht-konservativ gegenübergestellt. Sie wird auf Grund ihrer Eigenschaft, nicht zueinander homologe Enden zu verknüpfen, als „**Non-Homologous End-Joining**“ (NHEJ) bezeichnet. NHEJ ist der dominierende DSB-Reparaturweg in somatischen Zellen höherer Eukaryoten wie Säugern und Pflanzen.

In allen bislang untersuchten Organismen wurde das Vorhandensein beider Wege zur Beseitigung von DSBs gefunden (Übersicht in: Cromie *et al.*, 2001). Die Häufigkeit ihrer Verwendung hängt allerdings signifikant mit der Größe der zu Grunde liegenden Genome, den zur Verfügung stehenden Proteinen sowie nicht zuletzt von der Sequenz-Umgebung eines Doppelstrangbruches zusammen (Übersicht in: Shrivastav *et al.*, 2008). Es wird diskutiert, dass auf Grund der großen Zahl repetitiver Sequenzen in der Erbinformation höherer Eukaryoten die homologe Rekombination zu einer Instabilisierung des Genoms führen würde und daher das NHEJ trotz seines nicht-konservativen Charakters bevorzugt wird (Sonoda *et al.*, 2006). Weitere Faktoren, wie der Entwicklungszustand von Zellen in mehrzelligen Eukaryonten (Boyko *et al.*, 2006; Orii *et al.*, 2006) oder der Zellzyklus (Lee *et al.*, 1997; Aylon *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005, Delacôte & Lopez, 2008) nehmen ebenfalls Einfluss auf die Verwendung von HR oder NHEJ.

An der Prozessierung von DSBs sind zahlreiche Proteine beteiligt und konkurrieren um die freien Enden. In der Literatur wird zunehmend die Auffassung vertreten, dass die Reparaturmechanismen nicht als vordefinierte Wege zur Reparatur eines DSBs zu verstehen sind, sondern vielmehr als ein dynamischer Prozess, bei welchem abhängig von der Verfügbarkeit homologer Sequenzen oder

Mikrohomologien sowie der Präsenz verschiedener Protein-Faktoren ein Wettbewerb um diese freien Enden entsteht. Die DSB-Reparatur ist demnach als ein multifaktorieller Prozess aufzufassen, welcher zumindest zu Beginn kein präzise vorhersagbares Ergebnis hat. Erst nach mehreren enzymatischen Schritten sind die DSB-Enden in einer Weise prozessiert und entsprechende akzessorische Faktoren rekrutiert, so dass ein bestimmter Weg „beschriften“ wird (Kim *et al.*, 2005; Übersichten in: Haber, 2000; Wyman & Kanaar, 2006; Shrivastav *et al.*, 2008). Übergeordnete Regulationsmechanismen erlauben zudem eine Modulation der DSB-Reparaturmechanismen durch die Integration von perzipierten Umwelteinflüssen (Schuermann *et al.*, 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde zum Einen eine mechanistische Fragestellung zur DSB-Reparatur in Pflanzen bearbeitet und zum Anderen wurde eine Methode entwickelt, um die Effizienz der Doppelstrangbruch-Reparatur durch NHEJ zu quantifizieren (siehe Kapitel 1.5). Um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten, werden in den folgenden beiden Kapiteln zunächst die beiden verschiedenen der DSB-Reparatur zu Grunde liegenden Rekombinations-Mechanismen anhand der aktuellen Modelle beschrieben. Im Anschluss daran (Kapitel 1.4) werden alle relevanten bisher publizierten Untersuchungen hierzu an Pflanzen diskutiert.

1.2 Homologe Rekombination

Die Bezeichnung „homologe Rekombination“ wird generell zur Beschreibung der Interaktion von DNA-Molekülen verwendet, welche identische Sequenzen aufweisen. Bei der Beschreibung der HR muss zwischen *konservativer* und *nicht-konservativer* HR unterschieden werden. Durch die konservative homologe Rekombination können DSBs akkurat repariert werden, wobei homologe Sequenzinformation von verschiedenen Orten eines Genoms (Abbildung 1.2) zur Reparatur dienen können (Inbar *et al.*, 2000). Hierbei wird vorzugsweise die homologe Sequenz des Schwesterchromatids verwendet (Kadyk & Hartwell, 1992; Dronkert *et al.*, 2000; Gonzalez-Barrera *et al.*, 2003). DSBs können aber auch durch allelische Rekombination mit dem homologen Chromosom repariert werden (Palmer *et al.*, 2003). Des Weiteren können homologe Sequenzen von völlig anderen Stellen im Genom zur Reparatur durch Rekombination herangezogen werden: dieser

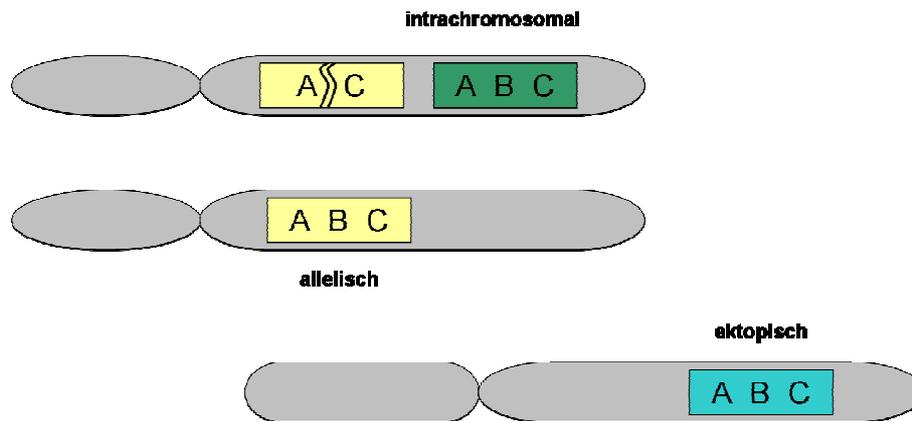


Abbildung 1.2: Homologe Sequenzen an verschiedenen Positionen im Genom können als Matrize zur Reparatur von DSBs dienen. Aus Puchta, 2005 (verändert).

Prozess wird als ektopische Rekombination bezeichnet (Inbar & Kupiec, 1999; Aylon & Kupiec, 2003). Die nicht-konservative homologe Rekombination beschreibt Ereignisse, bei welchen zwar homologe Sequenzen für die Reparatur verwendet werden, es jedoch trotzdem zu Sequenzveränderungen kommt (siehe unten).

Die **sequentiellen Schritte der homologen Rekombination** sind inzwischen weitestgehend bekannt und können in drei Stadien untergliedert werden (Übersichten in: Pâques & Haber, 1999; West, 2003; Aylon & Kupiec, 2004, Heyer *et al.*, 2006; Li & Heyer, 2008; San Filippo *et al.*, 2008):

- 1. Prä-Synapsis:** Bildung rekombinationsfähiger Enden durch nukleolytische Prozessierung und Ausbildung eines Nukleoproteinfilamentes, welches nach Sequenz-Homologien sucht,
- 2. Synapsis:** Ausbildung einer physikalischen Verbindung durch Stranginvasion in die doppelsträngige homologe Donorsequenz, wodurch ein Heteroduplex [„D-loop“] entsteht, gefolgt von der DNA-Synthese,
- 3. Postsynapsis:** Reparatur-Synthese des invasierenden Stranges durch Ligation von dessen 3'-OH-Ende und Auflösung der Rekombinations-Intermediate.

1.2.1 Modelle zur Beschreibung der homologen Rekombination

Im Jahre 1964 postulierte Robin Holliday eines der ersten Modelle für den Mechanismus der meiotischen homologen Rekombination in Hefe (Holliday, 1964). Nach diesem Modell treten Einzelstrangbrüche an homologen Stellen auf und zwei

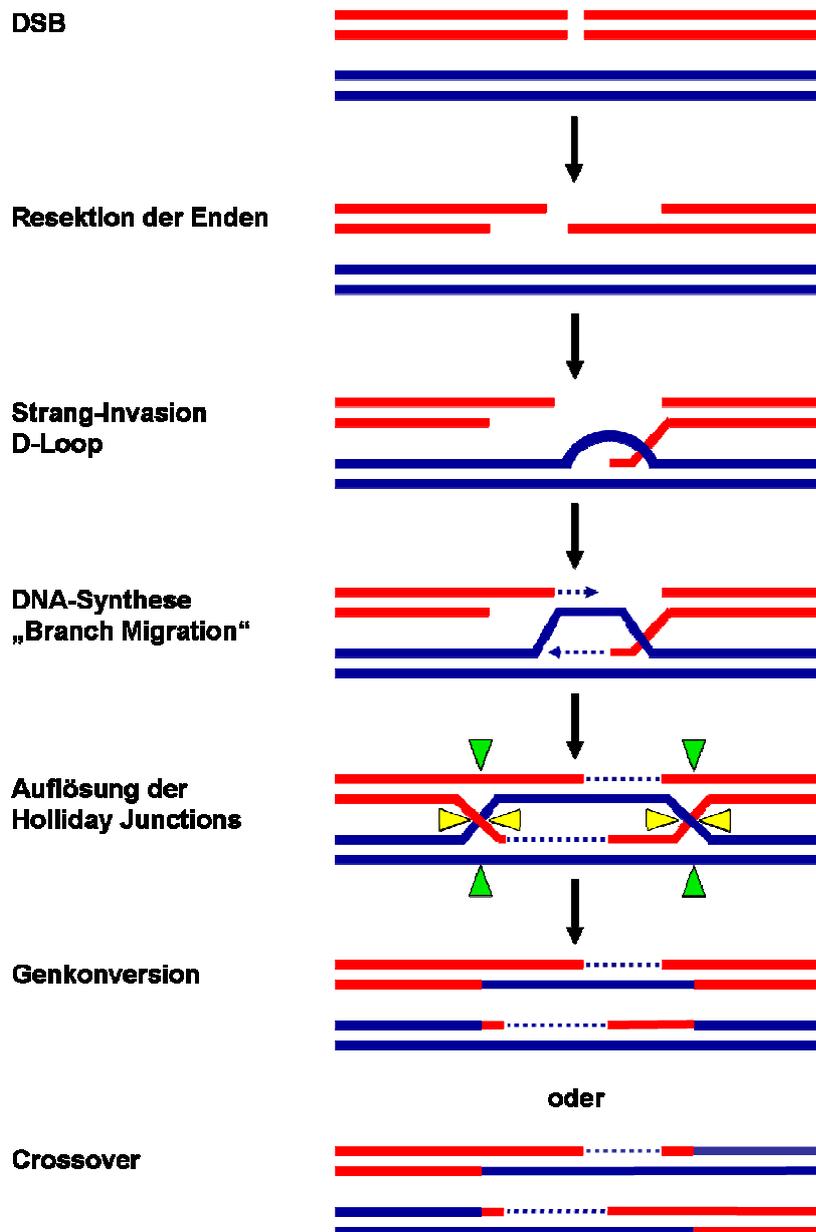


Abbildung 1.3: Das DSBR-Modell der homologen Rekombination. Die Enden eines DSBs werden exonukleolytisch prozessiert, anschließend erfolgt eine Stranginvasion eines der beiden überhängenden einzelsträngigen 3'-Enden des DSBs in eine homologe Sequenz (Donor-Duplex), wodurch es zur Ausbildung eines D-Loops kommt. Das freie 3'-OH-Ende der invasierenden Sequenz dient als Primer für die DNA-Synthese. Die verdrängte Duplex-Sequenz paart sich mit dem nicht-invasierenden Rezipientenstrang. Durch die fortschreitende DNA-Synthese kommt es zu einer Ausweitung des D-Loops („Branch Migration“). Nach Beendigung der DNA-Synthese werden die freien DNA-Enden ligiert, womit der DSB beseitigt ist. Erst eine Auflösung der dabei entstandenen Rekombinations-Intermediate (doppelte „Holliday-Junctions“) beendet den Reparaturprozess. Je nach Orientierung (grüne bzw. gelbe Pfeile) der dafür erforderlichen Schnitte zueinander kommt es zur Genkonversion (gleiche Orientierung) oder zu Crossover (unterschiedliche Orientierung). In jedem Falle werden homologe Sequenzen zwischen den Rekombinations-Partnern ausgetauscht.

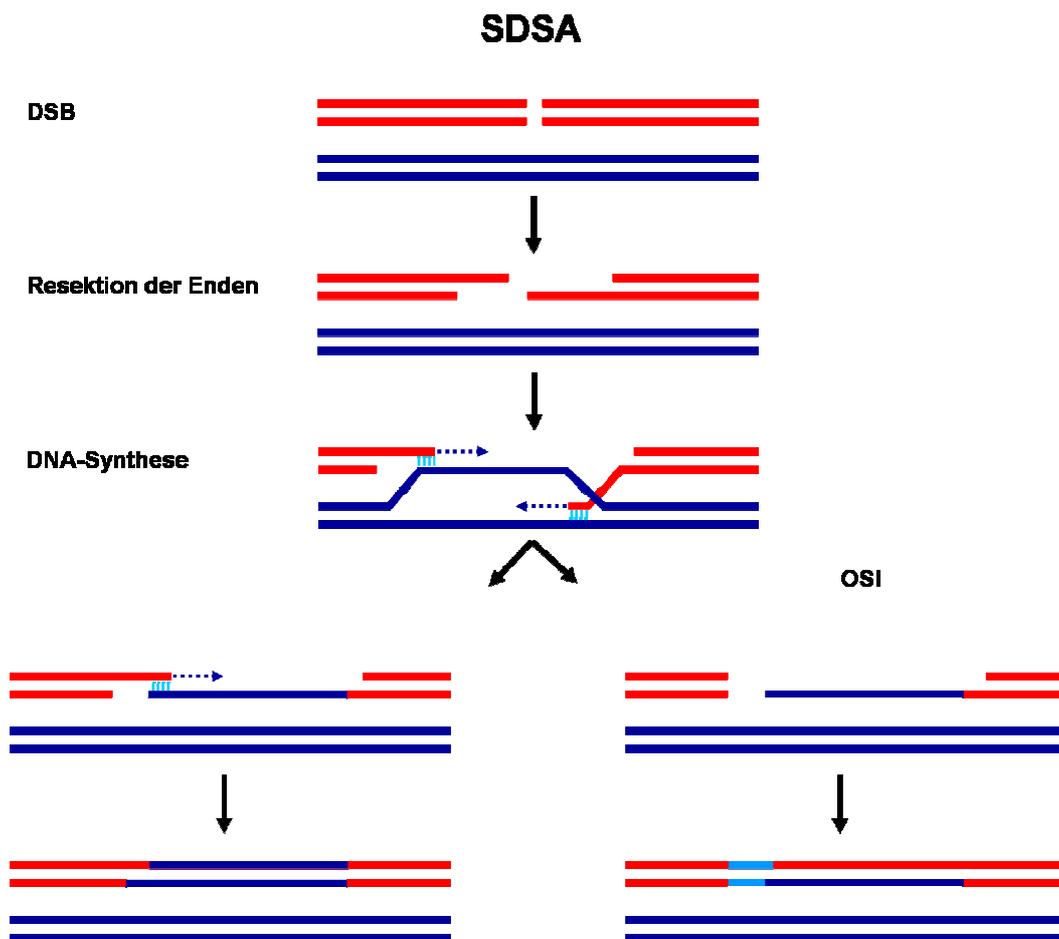


Abbildung 1.4: Das Synthesis-Dependent Strand-Annealing (SDSA)-Modell trägt der Beobachtung Rechnung, dass die Häufigkeit von Crossover-Ereignissen sowohl bei mitotischer als auch bei meiotischer HR geringer ist, als vorhergesagt (Nassif *et al.*, 1994). Nach diesem Modell findet die Invasion eines der beiden durch den DSB frei vorliegenden Enden des Akzeptormoleküls in die homologe Donor-Sequenz statt, während das andere Ende am verdrängten Strang des Heteroduplex binden und verlängert werden kann. Nach erfolgter DNA-Synthese wird der invasierende Strang mit dem zwischenzeitlich nukleolytisch prozessierten 5'-Ende des anderen Strangs verknüpft, wobei das Intermediat durch Basenpaarungen beider verlängerter Sequenzen stabilisiert wird. Die vorhandenen Lücken werden durch Reparatur-Synthese geschlossen und abschließend ligiert. Wird nur einer der beiden Stränge des Akzeptormoleküls verlängert (**One-sided Invasion, OSI-Modell**), können die Enden auch durch NHEJ verknüpft werden. Das SDSA-Modell kann Genkonversionen am Besten erklären, da keinerlei Crossover stattfindet.

Heteroduplexe im Donor- und Rezipientenstrang werden gebildet (Holliday, 1964; Aylon & Kupiec, 2004). Mit Hilfe dieses Modells konnten jedoch nicht alle bei der Bäckerhefe auftretenden meiotischen Rekombinationsprodukte erklärt werden. Basierend auf dem Modell von Holliday entwickelten Szostak *et al.* (1983) das **Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR)-Modell** (Abbildung 1.3). Mit Hilfe dieses Modells können nicht nur Genkonversionen, sondern auch Crossover-Ereignisse erklärt werden. Seitdem wurden anhand molekulargenetischer Daten weitere Modelle

zur Erklärung der homologen Rekombination entwickelt (Übersichten in: Pâques & Haber, 1999; Krogh & Symington, 2004).

Das **Synthesis-Dependent Strand-Annealing (SDSA)-Modell** (Abbildung 1.4) trägt der Beobachtung Rechnung, dass die Häufigkeit von Crossover-Ereignissen sowohl bei mitotischer als auch bei meiotischer HR geringer ist, als vorhergesagt (Nassif *et al.*, 1994). Dieses Modell kann Genkonversionen am Besten erklären, da keinerlei Crossover-Ereignisse stattfinden. Nach diesem Modell wird eine homologe Sequenz-Information in den DSB kopiert, ohne in der Donor-Sequenz verloren zu gehen (Gloor *et al.*, 1991). SDSA gilt als der vorherrschende Mechanismus der HR in somatischen Zellen (Nassif *et al.*, 1994; Chiurazzi *et al.*, 1996; Ray & Langer, 2002; Rubin & Levy, 1997; Puchta, 1998a). Mit Hilfe dieses Modells lassen sich auch Sequenz-Insertionen erklären (Abbildungen 1.4 und 1.9), welche formal dem NHEJ zuzurechnen sind.

Das **Single-Strand Annealing (SSA)-Modell** (Abbildung 1.5; Lin *et al.*, 1984 & 1990) beschreibt den oben genannten Mechanismus der *nicht-konservativen*

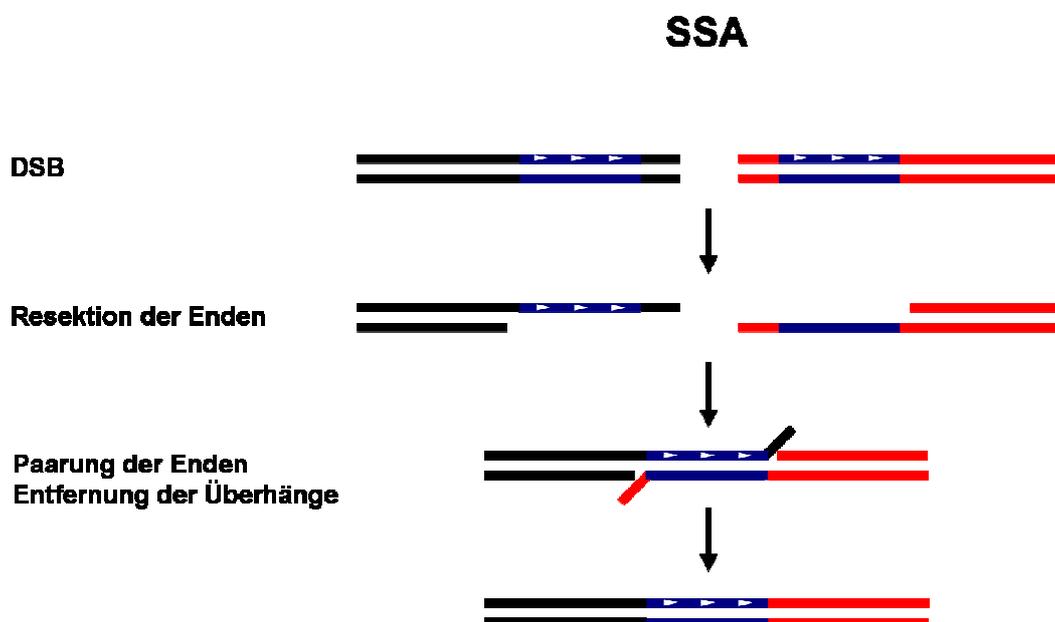


Abbildung 1.5: Das Single-Strand Annealing (SSA)-Modell beschreibt den Mechanismus der *nicht-konservativen* homologen Rekombination. Hierbei tritt ein DSB zwischen zwei identischen (homologen) Sequenzen gleicher Orientierung auf. Beide Strangenden werden exonukleolytisch prozessiert und es kommt zur Paarung der homologen Sequenzen. Ungepaarte einzelsträngige DNA wird durch Nukleasen abgebaut und die Lücken durch Reparatursynthese geschlossen und anschließend ligiert. Bei dieser Art der Reparatur kommt es zu einem Verlust von der den DSB flankierenden als auch einer der beiden homologen Sequenzen.

homologen Rekombination. Hierbei tritt ein DSB zwischen zwei identischen (homologen) Sequenzen auf. Bei dieser Art der Reparatur kommt es zu einem Verlust von der den DSB flankierenden als auch einer der beiden homologen Sequenzen (Pfeiffer *et al.*, 1994 & 2000).

Break-induced Replication (BIR): dieses Modell (Abbildung 1.6) erklärt sehr lange Genkonversionen, die mehrere hundert Kilobasenpaare umfassen können. Es wird diskutiert, dass der BIR-Mechanismus eine Rolle bei der Telomer-Erhaltung in Abwesenheit von Telomerase spielt (Lundblad & Blackburn, 1993; Lydeard *et al.*, 2007; Übersicht in: McEachern & Haber, 2006).

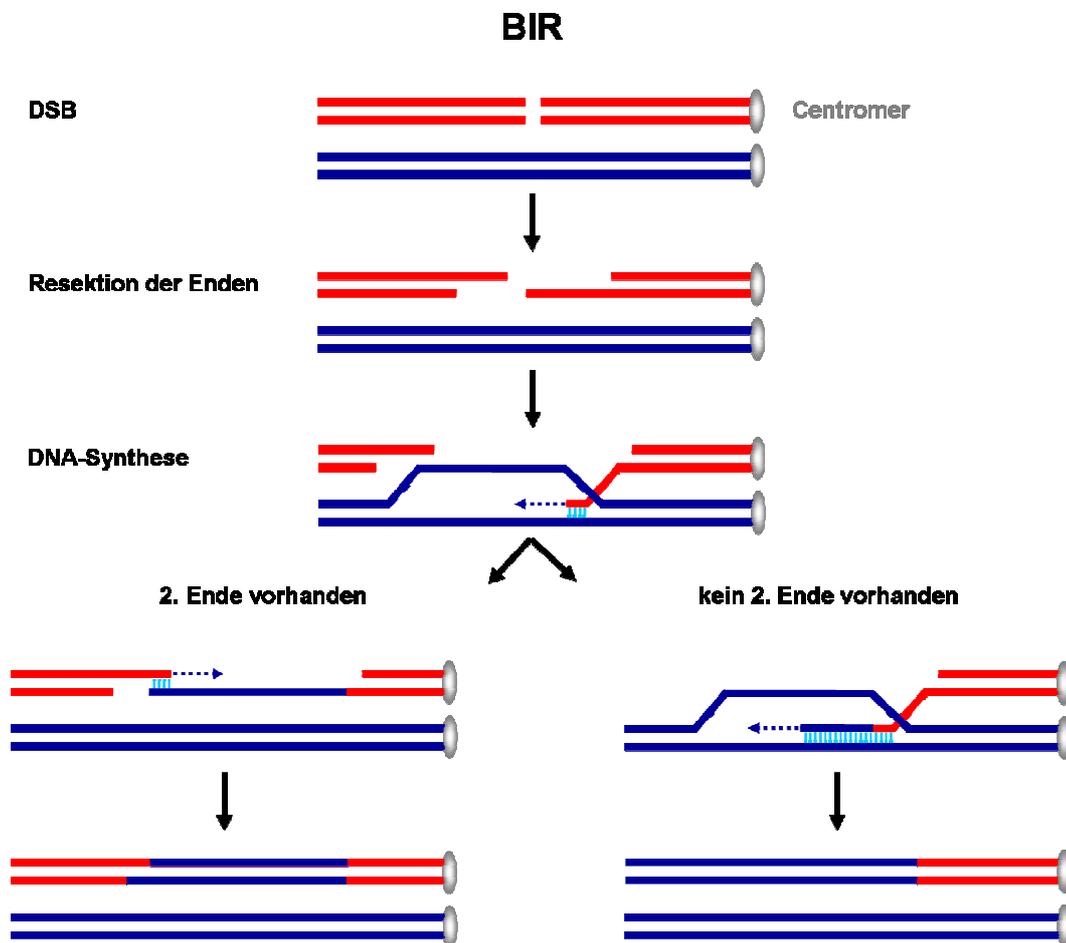


Abbildung 1.6: Break-induced Replication (BIR) beschreibt einen Mechanismus, welcher sehr lange Genkonversionen von mehreren hundert Kilobasen Länge erklärt. Hierbei kommt es zu einer Stranginvasion eines DSB-Endes und zur Ausbildung einer Replikationsgabel, wobei die DNA-Synthese Richtung distal des Centromers stattfindet. Es wurde gezeigt, dass nach der ersten Stranginvasion das verlängerte DSB-Ende auf der Suche nach einem komplementären Ende mehrfach aus dem migrierenden D-Loop entweicht und an anderer Stelle mit Hilfe von Sequenzhomologien eine Reinvansion stattfinden kann, wenn kein zweites freies Ende vorliegt (Smith *et al.*, 2007). Dieser Mechanismus wird auch als „Template Switching“ bezeichnet. Erst nach mehrfachem „Template Switching“ kommt es zu einer Erhöhung der Prozessivität bei der DNA-Synthese.

1.3 Non-Homologous End-Joining (NHEJ)

Dieser Mechanismus ist ein schneller und effizienter Weg zur Reparatur von DSBs, welcher in allen Organismen konserviert ist und insbesondere in den somatischen Zellen höherer Eukaryoten zur DSB-Reparatur beiträgt (Sargent *et al.*, 1997; Hefferin & Tomkinson, 2005; Clejan *et al.*, 2006; Übersichten in: Critchlow & Jackson, 1998; Lieber *et al.*, 2003; Aylon & Kupiec, 2004; Burma *et al.*, 2006; Riha *et al.*, 2006; Pitcher *et al.*, 2007; Shuman & Glickman; 2007).

Erste Berichte über diesen Reparaturweg finden sich bei Pellicer (1980) und Perucho (1980). Genauere Untersuchungen des NHEJ-Weges fanden in den folgenden Jahren in Säugerzellen (Wilson *et al.*, 1982; Roth *et al.*, 1985; Roth & Wilson, 1986; Übersicht in: Roth & Wilson, 1988), an *Xenopus*-Oocyten (Pfeiffer & Vielmetter, 1988; Thode *et al.*, 1990; Lehman *et al.*, 1994; Pfeiffer *et al.*, 1994) und in Hefen (Goedecke *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1994) statt. In Pflanzen wurden Untersuchungen zum NHEJ meist anhand der Integration von Transgenen (meist T-DNAs) untersucht (Matsumoto *et al.*, 1990; Mayerhofer *et al.*, 1991; Gheysen *et al.*, 1991; Hiei *et al.*, 1994; Ohba *et al.*, 1995; Papp *et al.*, 1996; Iglesias *et al.*, 1997; Takano *et al.*, 1997; Krizkova & Hroudá, 1998; Kohli *et al.*, 1999; Übersicht in: Tinland, 1996). Außerdem wurde das Rekombinations-Verhalten zwischen linearisierten Plasmid-Sequenzen (Gorbunova & Levy, 1997), die Zirkularisierung extrachromosomaler T-DNAs (Bakkeren *et al.*, 1989) und Deletionen an definierten Stellen im Pflanzengenom (Wessler *et al.*, 1990; Shirley *et al.*, 1992) untersucht.

1.3.1 Allgemeiner Ablauf des Non-Homologous End-Joining

Den ersten Schritt des NHEJ stellt das Binden spezifischer Proteine an die DNA-Enden des Doppelstrangbruchs dar, wodurch zum Einen ein nukleolytischer Abbau, der zu einem Verlust genetischer Information führen würde, verhindert wird und zum Anderen ein Kontakt zwischen den DNA-Enden über diese Proteine hergestellt wird (West *et al.*, 2002). Dies unterscheidet das NHEJ grundlegend von der homologen Rekombination, bei der die Verknüpfung der Enden erst durch einen exonukleolytischen Abbau der 5'-Enden und somit der Bildung von einzelsträngigen 3'-Überhängen möglich wird (Hefferin & Tomkinson, 2005; Sonoda *et al.*, 2006).

Anschließend werden die Enden, sofern sie kompatibel zueinander sind, religiert. Sind die DSB-Enden inkompatibel, erfolgt eine exonukleolytische Prozessierung der Enden, so dass 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen gebildet

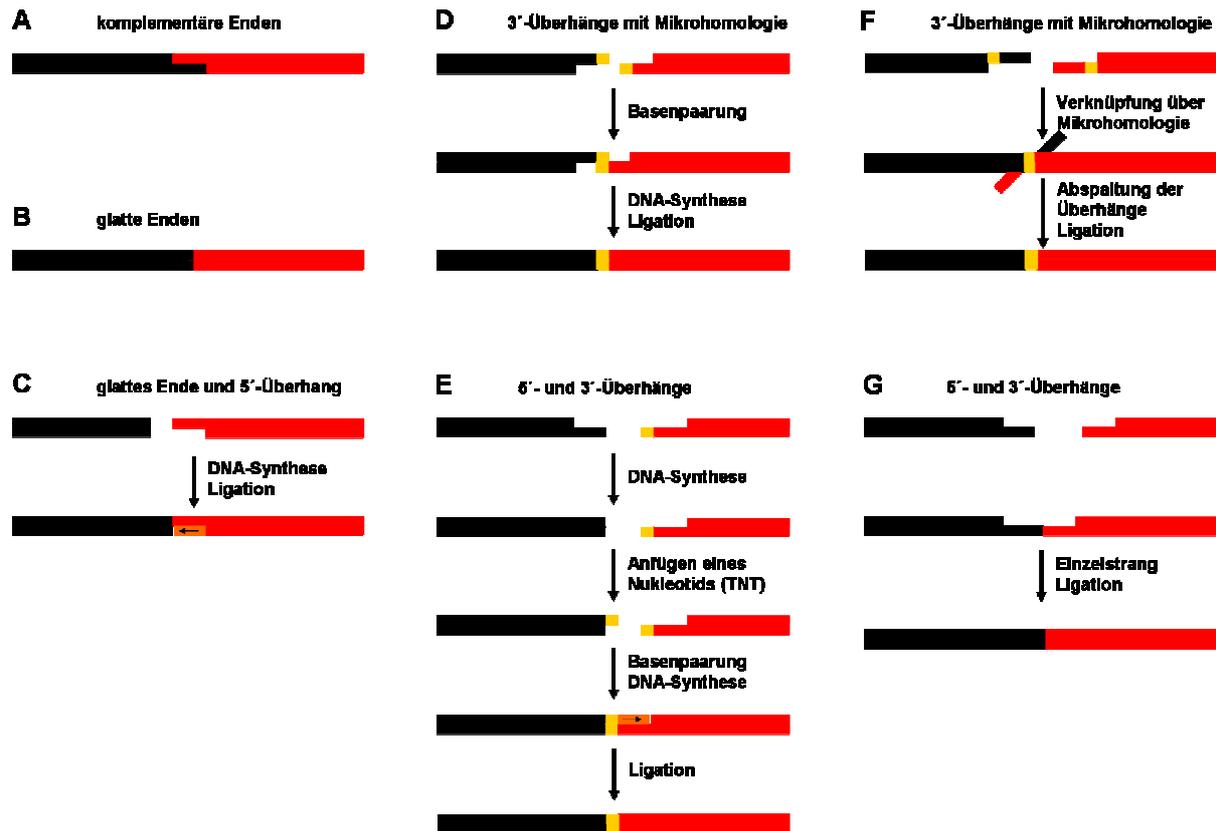


Abbildung 1.7: Verschiedene Verknüpfungsarten beim Non-Homologous End-Joining (NHEJ). Komplementäre (A) oder glatte (B) DNA-Enden werden durch einfache Ligation repariert. (C) Bei einem glatten Ende und einem Ende mit 5'-Überhang ist eine Auffüllsynthese des 3'-Endes notwendig, um zwei glatte Enden zu erhalten, die dann direkt ligiert werden können. (D) Die Verknüpfung nach diesem Modell wird durch Basenpaarungen zwischen Mikrohomologien beider DSB-Enden eingeleitet und durch DNA-Synthese und Ligation abgeschlossen. (E) Sind zwei 5'-Überhänge vorhanden, wird durch DNA-Synthese ein glattes Ende erzeugt. Durch die Aktivität der Terminalen Nukleotid Transferase (TNT) wird ein Nukleotid an das glatte DSB-Ende angehängt. Dieses Nukleotid ermöglicht die Paarung mit dem anderen DNA-Ende. Die verbleibende Lücke wird durch DNA-Synthese aufgefüllt, anschließend erfolgt die Ligation. (F) Ist bei beiden DSB-Enden eine Mikrohomologie vorhanden, kann der Bruch durch einen dem SSA-Mechanismus ähnlichen Prozess ablaufen. Die nicht homologen DNA-Abschnitte werden nach der Basenpaarung der homologen Bereiche entfernt und die Lücken durch DNA-Synthese geschlossen. (G) Die Verknüpfung des DSBs wird durch Ligation zweier herausragender Einzelsträngen (ein 5'-Überhangende und ein 3'-Überhangende) eingeleitet und durch das Auffüllen der Lücke über DNA-Synthese beendet. In den Fällen (D - G) kommt es zu Sequenzveränderungen. Nach Tsukamoto & Ikeda, 1998; Pastwa & Blasiak, 2003 (verändert).

werden (Lieber *et al.*, 2003; Downs & Jackson, 2004; Bray & West, 2005; Hefferin & Tomkinson, 2005; Wyman & Kanaar, 2006). Die Überhänge werden durch Paarung von wenigstens einem Basenpaar verknüpft und entstandene Lücken durch Reparatur-Synthese aufgefüllt oder einige überstehende Basen entfernt. Schließlich erfolgt eine Ligation, so dass intakte DNA-Stränge mit Insertionen oder Deletionen entstehen (Moore & Haber, 1996; Pipiras *et al.*, 1998). Abhängig von Struktur und Sequenz der DNA-Enden kann es zu unterschiedlichen Arten der Verknüpfung

kommen, die in Abbildung 1.7 dargestellt sind. Zahlreiche Untersuchungen in verschiedenen Organismen zeigen zudem, dass auch Sequenz-Informationen von andern genomischen Loci in den Bruch kopiert werden können (zum Mechanismus: siehe Abbildung 1.9).

1.4 Untersuchungen zur DSBR in höheren Pflanzen

Zahlreiche Untersuchungen an Bakterien, Hefen und tierischen Zellen haben zu einem erheblichen Teil zum Verständnis von DSB-Reparaturmechanismen beigetragen. In den letzten 20 Jahren wurde diesen Prozessen in Pflanzen zunehmend mehr Interesse entgegengebracht. Untersuchungen zur DNA-Rekombination bei Pflanzen sind insofern von besonderer Signifikanz, da diese, wie eingangs diskutiert, keine prädeterminierte Keimbahn besitzen und somit genetische Veränderungen in meristematischem Gewebe vor der Blütenbildung in der Keimbahn fixiert werden kann (McClintock, 1984; Walbot, 1985; Das *et al.*, 1990). Die Analyse somatischer Rekombination ist auch deshalb von entscheidender Bedeutung, da die Herstellung transgener Pflanzen in der Regel auf der stabilen genetischen Transformation somatischer Zellen beruht. Jedes Einbringen von neuer Sequenz-Information erfordert den Austausch von DNA-Molekülen – daher ist ein Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen essentiell zur Erarbeitung effizienterer Methoden zur gerichteten Transgen-Integration. In verschiedenen Arbeiten wurden zunächst extrachromosomale Rekombinations-Ereignisse untersucht, um die der DSB-Reparatur zu Grunde liegenden Mechanismen in Pflanzen zu charakterisieren.

1.4.1 Extrachromosomale Rekombination

Die einfachste und schnellste Art, DNA-Rekombinationsmechanismen *in planta* zu untersuchen, ist das Einbringen extrachromosomaler DNA in somatische Pflanzenzellen und die Untersuchung ihres Rekombinations-Verhaltens. Hierdurch konnten zahlreiche grundlegende Merkmale der HR und des NHEJ in Pflanzen aufgeklärt werden (Puchta, 2005).

1.4.1.1 Extrachromosomale homologe Rekombination

Zur Untersuchung der extrachromosomalen homologen Rekombination wurden auf einem oder mehreren DNA-Molekül(en) nicht-funktionelle, sich überlappende Teile von Reporter- bzw. Selektionsmarkergenen transferiert. Diese

können *in vivo* mit der DSB-Reparatur-Maschinerie im pflanzlichen Zellkern interagieren (Übersicht in: Puchta & Meyer, 1994). Das Einbringen der DNA erfolgte hierbei durch PEG-Transformation, Beschuss mit der Partikelkanone oder unter Verwendung von T-DNA-Molekülen von *Agrobacterium tumefaciens* (Offringa *et al.*, 1990; Tinland *et al.*, 1994). In den ersten Arbeiten hierzu wurde die Restauration von Selektionsmarkergenen zur Detektion extrachromosomaler Rekombination in Tabak verwendet (Wirz *et al.*, 1987; Baur *et al.*, 1990; Offringa *et al.*, 1990). Ein alternatives System zur Untersuchung extrachromosomaler Rekombination wurde von Puchta & Hohn (1991a) beschrieben: hierbei wurde das Reporter-gen β -Glucuronidase zur Detektion extrachromosomaler Rekombination in Protoplasten von *Nicotiana glauca* eingesetzt und es wurden Sequenz-Homologien von bis zu 1200 Nukleotiden verwendet. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen der Länge sich überlappender Sequenz-Homologien mit der Häufigkeit der homologen Rekombination gefunden werden. Die Rekombinations-Frequenz fiel jedoch unterhalb einer Sequenz-Homologie von etwa 500 Nukleotiden rapide ab. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass nur bei ausreichend langen Sequenz-Homologien die HR die Stabilität des mit vielen repetitiven Elementen durchsetzten Pflanzengenoms nicht beeinträchtigt (Puchta & Hohn, 1991a). Ein dem von Puchta & Hohn (1991a) beschriebenen Verfahren vergleichbares System wurde von Lyznik *et al.* (1991) in Mais-Protoplasten getestet.

Eine genauere Untersuchung der Rekombinationsvorgänge zeigte, dass die extrachromosomale Rekombination in Pflanzen hauptsächlich nach dem oben diskutierten SSA-Modell abläuft (Abbildung 1.5; Puchta & Hohn, 1991b). Dabei werden aus den eingebrachten doppelsträngigen Plasmid-Molekülen durch Exonukleasen der Pflanze einzelsträngige DNA-Bereiche freigesetzt, welche dann miteinander interagieren können. Das resultierende Rekombinations-Intermediat wird ebenfalls durch pflanzliche Enzyme in einen reparierten Doppelstrang überführt. Der zu Grunde liegende Mechanismus gleicht dem für mammalische Zellen (Lin *et al.*, 1984) und *Xenopus*-Oocyten (Maryon & Carroll, 1991) gefundenen und wird auch für Hefe beschrieben (Fishman-Lobell *et al.*, 1992). Unter Verwendung einzelsträngiger DNA als Rekombinations-Substrat konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Bilang *et al.*, 1992; De Groot *et al.*, 1992). Puchta *et al.* (1992) konnten zudem zeigen, dass die extrachromosomale Rekombinations-Reaktion nur innerhalb einer

relativ kurzen Zeitdauer nach der Transfektion stattfindet (ca. 30 Minuten) und dass dies unabhängig von Methylierungen der DNA geschieht. Die Effizienz der extrachromosomalen Rekombination ist dabei sehr viel höher als Rekombinations-Prozesse zwischen extrachromosomaler und genomischer DNA bzw. intrachromosomale Rekombination (Puchta, 1999). Dies wird damit erklärt, dass extrachromosomale DNA in dieser kurzen Zeit nach der Transfektion nicht mit Chromatin assoziiert ist und die Chromatinstruktur eine bedeutende Rolle bei der Stabilität des hochrepetitiven Pflanzengenoms spielt (Puchta *et al.*, 1992). Dies wird durch neuere Untersuchungen von Osakabe *et al.* (2006) an *Arabidopsis*-Mutanten des RAD54-Gens untermauert, welches unter anderem eine Funktion bei der Chromatin-Umstrukturierung hat (Shaked *et al.*, 2006).

1.4.1.2 Extrachromosomales NHEJ

Gorbunova & Levy (1997) konnten durch das Einbringen *in vitro* linearisierter Plasmide mit verschiedenen Enden in Tabak-Protoplasten zeigen, dass selten Verknüpfungen ohne Veränderungen der Sequenz (Ligation) stattfinden. Meistens wurden Deletionen an beiden Enden gefunden, wobei eine Verknüpfung häufig an Stellen mit kurzen Sequenzwiederholungen beobachtet wurde. Die Verknüpfung von Bruchenden über solche Mikrohomologien wird durch einen SSA-ähnlichen Mechanismus erklärt. Überraschend traten bei der extrachromosomalen Reparatur in etwa 30 % der untersuchten Fälle Insertionen („Filler-Sequenzen“) bis zu 1,2 kb Länge auf. Diese entstammten sowohl den verwendeten Plasmiden als auch der genomischen Tabak DNA, wobei auch Kombinationen von beiden gefunden wurden (Gorbunova & Levy, 1997). Für diese Insertionen wird ein dem SDSA-Modell (Nassif *et al.*, 1994) vergleichbarer Mechanismus diskutiert (Abbildung 1.9; Gorbunova & Levy, 1997 & 1999; Rubin & Levy, 1997; Salomon & Puchta, 1998). Danach reichen schon sehr kurze Mikrohomologien von wenigen Basenpaaren zum Start einer DNA-Synthese aus. Diese Beobachtungen decken sich mit *in vitro*-Daten, welche mit Extrakten aus *Xenopus*-Oocyten gewonnen wurden (Lehman *et al.*, 1994). Vergleichbare Ergebnisse erzielten Bakkeren *et al.* (1989) bei der Analyse *in vivo* zirkularisierter extrachromosomaler T-DNAs.

1.4.2 Limitierende Faktoren bei der Untersuchung extrachromosomaler Rekombination

Bei allen Erkenntnissen, welche auf extrachromosomale Rekombination zurück zu führen sind, muss bedacht werden, dass die beschriebenen Reaktionen direkt nach der Transformation stattfinden, wenn die Plasmid-DNA im Gegensatz zur genomischen DNA nicht mit Chromatin assoziiert ist (Puchta *et al.*, 1992). Außerdem werden mehrere hundert bis tausend DNA-Moleküle in eine einzige Zelle eingebracht, wodurch die DSB-Reparatur-Maschinerie mit einer nicht-physiologischen Situation konfrontiert wird. Da eine artifizielle Situation immer den Ausgang des Experimentes beeinflussen kann, können auch die Reparaturprozesse selbst anders als unter physiologischen Bedingungen verlaufen (Puchta & Meyer, 1994). Aus diesem Grunde ist die Untersuchung intrachromosomaler Rekombinations-Prozesse durch Induktion von DSBs im Pflanzengenom mit Sicherheit von höherer Aussagekraft. Voraussetzung für die Untersuchung von Mechanismen der DSB-Reparatur *in vivo* ist das Vorhandensein eines DSBs im Pflanzengenom zu einem bestimmten Zeitpunkt und vorzugsweise an einem definierten Locus.

1.4.3 Erzeugung von Doppelstrangbrüchen im Pflanzengenom

Eine Möglichkeit hierzu besteht darin, *in vitro* mit Restriktionsendonukleasen geschnittene Plasmid-DNA in Pflanzenzellen einzubringen (Gorbunova & Levy, 1997). Des Weiteren können DSBs *in vivo* durch Strahlung, Chemikalien, während der Transposition mobiler genetischer Elemente (Transposons) oder durch Verwendung selten schneidender Restriktionsendonukleasen erzeugt werden (siehe Kapitel 1.4.4.1 und 1.4.4.2). Erste Untersuchungen der intrachromosomalen Rekombination wurden unter Verwendung von ionisierender Strahlung durchgeführt.

1.4.4 Intrachromosomale Rekombination

Eine klassische Methode zur *in vivo* Induktion von DSBs und damit zur Untersuchung der intrachromosomalen Rekombination in Pflanzen ist die Anwendung von Röntgenstrahlung. Diese wurde zur Erzeugung von Mutationen im Genom von *Arabidopsis* von Rédei & Li (1969) und Shirley *et al.* (1992) angewandt. In Tabak mit entsprechenden Reportersystemen wurde gezeigt, dass eine Behandlung der Pflanzen mit Röntgenstrahlung zu einer starken Zunahme der HR

führt, welche auf eine DSB-Induktion zurück zu führen war (Tovar & Lichtenstein, 1992). Diese Ergebnisse wurden von Lebel *et al.* (1993) bestätigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch weitere abiotische Stressfaktoren wie Hitzeschock zu einer Steigerung der HR-Frequenz führen (Lebel *et al.*, 1993). Ein Nachteil bei der Verwendung von Röntgenstrahlung ist jedoch die Tatsache, dass andere Arten von Schäden in den behandelten Zellen auftreten. Zwar kann durch die Strahlungs-dosis die Anzahl der DSBs beeinflusst werden, nicht jedoch ihre Lokalisation. Daher treten DSBs nur bei einem Bruchteil aller behandelten Zellen an einer definierten Stelle auf. Folglich sind die gemessenen Rekombinationsfrequenzen erheblich niedriger als bei der Betrachtung eines definierten Locus. Aus diesem Grunde werden zur Untersuchung ortsspezifischer DSBs in Pflanzen verschiedene Methoden angewandt.

1.4.4.1 Induktion ortsspezifischer DSBs im Pflanzengenom

Eine Möglichkeit zur ortsspezifischen Induktion eines DSBs besteht in der Verwendung von Transposons (Athma & Peterson, 1991; Lowe *et al.*, 1992; Shalev & Levy, 1997; Xiao & Peterson, 2000). Diese werden durch die Transposase aus dem Donor-Locus herausgeschnitten, bevor sie andernorts im Genom integrieren. Der bei der Exzision des Transposons entstehende DSB wird hauptsächlich durch NHEJ repariert (Rinehart *et al.*, 1997). Eine Zunahme der HR konnte beobachtet werden, wenn nahe des Exzisionsortes homologe Sequenzen lokalisiert waren (Athman & Peterson, 1991; Lowe *et al.*, 1992; Xiao & Peterson, 2002). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der Verwendung selten schneidender Endonukleasen (Perrin *et al.*, 1993) anstelle von Transposons erzielt, womit der DSB als Ursache feststand (Chiurazzi *et al.*, 1996; Siebert & Puchta, 2002; Orel *et al.*, 2003).

Durch Regulation des Expressionszeitpunktes der Transposase bzw. der selten schneidenden Endonuklease kann der Zeitpunkt der DSB-Induktion kontrolliert werden. Die Expression kann transient (Puchta, 1999a), unter der Kontrolle induzierbarer Promotoren (Schmidt-Puchta *et al.*, 2004) oder konstitutiv erfolgen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur *in vivo* Erzeugung von DSBs im Pflanzengenom die Homing Endonuklease I-SceI verwendet.

1.4.4.2 Die Homing Endonuklease I-SceI

Homing Endonukleasen sind sehr selten schneidende Enzyme, welche meistens von Introns kodiert werden oder in Intein-enthaltenden Proteinen zu finden sind. Sie katalysieren eine Reaktion, bei welcher an einem präzise determinierten Locus ein Doppelstrangbruch induziert wird, für dessen Reparatur durch Genkonversion das die Endonuklease kodierende Intron dient. Dabei kommt es zu einer Insertion der Intron-Sequenz in die „Homing site“ (Jurica & Stoddard, 1999).

I-SceI ist das Translationsprodukt eines Gruppe I-Introns im mitochondrialen 21S rRNA-Gen und war die erste entdeckte Homing-Endonuklease (Jacquier & Dujon, 1985; Perrin *et al.*, 1993). Diese Endonuklease hat mit anderen Intron-kodierten Proteinen die beiden Sequenz-Motive LAGLI-DADG gemeinsam (Hensgens *et al.*, 1983). I-SceI erkennt eine asymmetrische DNA-Sequenz von 18 Basenpaaren Länge und spaltet diese in Gegenwart von Mg^{2+} unter Bildung von 3'-Überhängen von jeweils vier Nukleotiden Länge, welche direkt ligiert werden können (Colleaux *et al.*, 1988; Monteilhet *et al.*, 1990; Abbildung 1.8). Die katalytische Aktivität von I-SceI lässt sich auf zwei sukzessive Einzelstrangbrüche zurück führen, wobei die Aktivität dieses Enzyms relativ niedrig ist und durch das erste katalytische Intermediat gehemmt wird (Perrin *et al.*, 1993). Im Jahre 2003 gelangen Moure *et al.* die Beschreibung der katalytischen Aktivität von I-SceI in atomarer Auflösung.

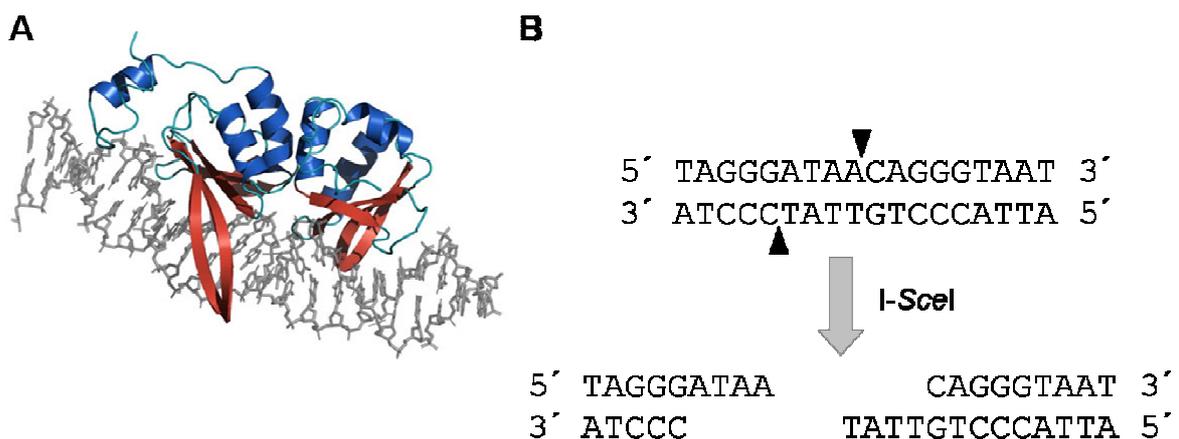


Abbildung 1.8: Die Homing Endonuklease I-SceI. (A) Die Darstellung des an dsDNA gebundenen I-SceI-Proteins als Bestandteil dieser Abbildung wurde freundlicherweise von COLLECTIS SA (Romainville Cedex, Frankreich) genehmigt. (B) Erkennungssequenz von I-SceI. Die 18 Nukleotide umfassende Erkennungssequenz wird von I-SceI geschnitten, wobei 3'-Überhänge von 4 Nukleotiden Länge entstehen. Die Enden sind direkt ligierbar.

Auf Grund der hohen Spezifität von I-SceI und der Länge der Schnittstelle ist ein zufälliges Auftreten dieser Erkennungssequenz mit $1 : 4^{18}$ sehr unwahrscheinlich. Statistisch tritt diese Erkennungssequenz in vier Tabak-Genomen bzw. 70 *Arabidopsis*-Genomen zufällig einmal auf. In Wirklichkeit ist dieser Wert niedriger, da einige Austausch in der Erkennungssequenz durchaus toleriert werden (Colleaux *et al.*, 1988). Zahlreiche Arbeiten belegen jedoch, dass auch die konstitutive Expression von I-SceI keinen detektierbaren Phänotyp bei *Arabidopsis* (Orel *et al.*, 2003) oder Tabak (Salomon & Puchta, 1998) hervorruft. Das seltene Auftreten seiner Erkennungssequenz macht I-SceI besonders geeignet zur gezielten Induktion von Doppelstrangbrüchen in Genomen höherer Eukaryoten. Da die Homing Endonuklease jedoch ein mitochondriales Enzym ist und keinerlei Kernlokalisationssignal besitzt, war zunächst unklar, ob dieses Protein überhaupt in den Kern gelangen würde. Plessis *et al.* (1992) konnten zweifelsfrei belegen, dass I-SceI in den Zellkern von Hefe transloziert und funktionell aktiv ist.

Damit stand eine einzigartige Möglichkeit offen, in Genomen höherer Eukaryoten gezielt Doppelstrangbrüche zu induzieren und deren Reparatur zu untersuchen bzw. diese für biotechnologische Anwendungen zu nutzen. So wurde I-SceI erstmals von Puchta *et al.* (1993) in Pflanzen zur *in vivo*-Induktion von DSBs verwendet. Hierbei wurde eine Zunahme der ortsspezifischen homologen Rekombination um zwei Größenordnungen gefunden. Choulika *et al.* (1994 & 1995) konnten nach dem Einbringen der I-SceI-Erkennungssequenz in das Mausgenom erstmals zeigen, dass durch Expression dieses Enzyms die ortsspezifische homologe Rekombination um mehr als das 1000-fache gesteigert wird.

1.4.5 DSBR mittels homologer Rekombination in somatischen Pflanzenzellen

Die allermeisten Untersuchungen zur DSB-Reparatur in Pflanzen konzentrieren sich auf die homologe Rekombination. Diese ist, wie eingangs diskutiert, in somatischen Zellen höherer Pflanzen von eher untergeordneter Bedeutung. Andererseits besteht ein erhebliches akademisches und wirtschaftliches Interesse an gezielten und präzise kontrollierbaren Veränderungen im Pflanzengenom – dem „Gene Targeting“. Dieses beruht auf der ortsspezifischen und gerichteten Transgen-Integration durch homologe Rekombination. Wie oben diskutiert, hängt die Effizienz der HR in erheblichem Maße von dem Vorhandensein

homologer Sequenzen und ihrer Lokalisation ab. Dabei können Sequenzen aus verschiedenen Bereichen des Genoms kopiert werden (Abbildung 1.2).

1.4.5.1 Ektopische homologe Rekombination

Wie häufig werden ektopische Sequenzen für die DSB-Reparatur im Pflanzengenom verwendet? Diese Fragestellung wurde erstmals von Shalev & Levy (1997) in Tabak untersucht: hierbei wurde gezielt in einem transgenen Akzeptor-Locus ein DSB durch Expression der *Ac*-Transposase aus Mais (McClintock, 1931; Übersicht zum Transpositionsmechanismus in: Saedler & Nevers, 1985) herbeigeführt. Sowohl der Donor- als auch der nicht damit gekoppelte Akzeptor-Locus trugen ein nicht-funktionelles β -Glucuronidase-Reporter-gen mit Sequenzhomologien von 500 bzw. 1500 Nukleotiden beiderseits der Transposon-Exzisionsstelle. Die Herstellung eines funktionierenden Reporter-gens konnte nur durch das Kopieren von Sequenz-Information vom ektopischen Donor-Locus in den Akzeptor-Locus zustande kommen. In dieser Studie wurde gefunden, dass etwa einer von 10.000 DSBs (Rekombinationsfrequenz: 10^{-5}) durch ektopische homologe Rekombination repariert wird (Shalev & Levy, 1997).

Mit einem ähnlichen System unter Verwendung von *I-SceI* zur DSB-Induktion und mit nicht-funktionellen Teilen eines Kanamycin-Selektionsmarkers als Reporter-gen konnten diese Daten bestätigt werden (Puchta, 1999). Molekulare Analysen von Rekombinations-Ereignissen zeigten, dass die Reparatur trotz vorhandener Sequenz-Homologien zwischen Donor und Akzeptor-Sequenz beiderseits des erzeugten DSBs nicht notwendigerweise an beiden Bruchenden durch HR erfolgte. So wurde häufig eine Kombination von HR und NHEJ an den Enden eines DSBs gefunden (Puchta, 1999), wie dies bereits einige Jahre früher bei der Untersuchung des Rekombinationsverhaltens von durch *Agrobacterium tumefaciens* transferierten T-DNA-Molekülen mit einem *I-SceI*-vermittelten DSB beobachtet wurde (Puchta *et al.*, 1996). Da in der Studie von Puchta *et al.* (1996) dieselben Donor- und Akzeptor-Sequenzen wie in der 1999 publizierten Studie verwendet wurden, konnte zudem ein Vergleich zwischen ektopischer Sequenz und T-DNA als Donor für die HR durchgeführt werden. Die Verwendung von T-DNA als homologe Donorsequenz führt hierbei zu einer deutlich höheren Rekombinationsfrequenz (10^{-3} im Gegensatz zu 10^{-5}). Dies wird damit erklärt, dass

die T-DNA leichter zugänglich für die Proteine des Rekombinationsapparates sei (Puchta, 1999; siehe Kapitel 1.4.1.1).

Die Beobachtung, dass bei der Reparatur eines DSBs unterschiedliche Ausgänge durch HR und NHEJ auftreten, führte zu der Erkenntnis, dass das klassische DSBR-Modell von Szostak (1983, siehe Kapitel 1.2.1) für die DSB-Reparatur in somatischen Pflanzenzellen nicht zutrifft, da nach diesem beide Enden grundsätzlich durch HR repariert werden (siehe Abbildung 1.3). Diese Ergebnisse lassen sich vielmehr unter Berücksichtigung anderer Modelle zur Beschreibung von Rekombinations-Prozessen verwenden. Sowohl das „One-sided Invasion“ (OSI)-Modell (Belmaaza & Chartrand, 1994) als auch das SDSA-Modell (Formosa & Alberts, 1986; Nassif *et al.*, 1994; Keeler & Gloor, 1997) können diese Ergebnisse erklären (Abbildung 1.4). Allerdings können nach dem OSI-Modell grundsätzlich nur Kombinationen aus HR und NHEJ bei der Reparatur eines DSBs auftreten, wogegen das SDSA-Modell sowohl diesen Fall als auch die Reparatur beider Enden durch HR berücksichtigt.

Um diese Interpretation zu verifizieren, wurden in einer weiteren Arbeit T-DNAs als homologe Donor-Sequenz zur Reparatur eines I-SceI-induzierten DSBs verwendet, wobei in einem Falle die T-DNA Homologien zu beiden Bruchenden und im anderen Fall nur zu einem der beiden Enden trug. Dabei wurde gefunden, dass die DSB-Reparatur beim Vorhandensein einer einseitigen Sequenz-Homologie im Vergleich zur Reparatur in Gegenwart von Sequenzhomologien beiderseits des zu reparierenden Bruches etwa halb so effizient ist. Eine einseitige Sequenzhomologie ist offensichtlich ausreichend zur Reparatur von DSBs, daher lassen sich DSBR-Ereignisse in somatischen Pflanzenzellen durch unabhängige Interaktion der beiden Enden zu erklären. Folglich ist das SDSA-Modell der HR am Besten zur Erklärung der gefundenen Daten geeignet (Puchta, 1998).

Das SDSA-Modell beschreibt die DSBR ohne das Auftreten von Holliday Junctions. Hierbei findet die Reparatur entweder an einem der beiden reparierten DSB-Enden durch NHEJ und am anderen durch HR statt oder aber durch HR an beiden Enden. Letzteres führt zur Genkonversion ohne das Auftreten von Crossover-Ereignissen. Damit lassen sich die Genkonversions-Ereignisse in somatischem

Gewebe von denen in meiotischem grundsätzlich differenzieren. Während in Letzterem das Auftreten von doppelten Holliday Junctions (Schwacha & Kleckner, 1995) und die in etwa der Hälfte der Fälle resultierenden Crossover-Ereignisse notwendig für die genetische Diversität sind, vermeidet das Vorherrschen der Genkonversion in somatischem Gewebe Crossover zwischen ektopischen Sequenzen (Richardson *et al.*, 1998). Dies ist insbesondere bei den hochrepetitiven Pflanzengenomen von Bedeutung für die genetische Stabilität. Dennoch kann es auch zu Crossover-Ereignissen zwischen Schwesterchromatiden oder homologen Chromosomen in somatischen Zellen kommen. Um den relativen Beitrag dieser Rekombinationsvorgänge einschätzen zu können, wurden Experimente zur allelischen homologen Rekombination durchgeführt.

1.4.5.2 Allelische homologe Rekombination

Während der Meiose werden DSBs durch spezifische Enzyme hervorgerufen. Ihre Reparatur erfolgt unter Verwendung des homologen Chromosoms, wobei es zu Crossover oder Genkonversionen kommt. Zum Verständnis von Rekombinationsprozessen in somatischem Gewebe ist es erforderlich, den potentiellen Beitrag allelischer Rekombination in diesem Gewebe zu untersuchen.

In der Tat konnten Gisler *et al.* (2002) unter Verwendung transgener heteroallelicher Tabak-Pflanzen das Auftreten DSB-induzierter allelischer Rekombination in somatischem Gewebe zeigen. Die Frequenz dieser Ereignisse wurde auf etwa 10^{-4} geschätzt und ist damit vergleichbar mit der Häufigkeit von ektopischen Rekombinations-Ereignissen (Shalev & Levy, 1997; Puchta, 1999). Da die natürliche HR-Frequenz im Bereich zwischen 10^{-6} und 10^{-7} liegt (Swoboda *et al.*, 1994), kann die allelische Rekombination in somatischen Zellen zwar durch einen gezielt eingeführten DSB um etwa drei Größenordnungen gesteigert werden, sie ist allerdings zu ineffizient, um in diesen Zellen von Bedeutung zu sein. Diese geringe Effizienz könnte eine Voraussetzung für die Fixierung von Genomveränderungen in somatischem Gewebe sein (Puchta, 2005).

1.4.5.3 Intrachromosomale homologe Rekombination

Diverse Untersuchungen zur intrachromosomalen DSBR in Pflanzen wurden in früheren Arbeiten durchgeführt, wodurch ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden Reparaturwege und der Häufigkeit ihrer Verwendung erlangt wurde

(Athma & Peterson, 1991; Chiruzzi *et al.*, 1996; Xiao & Peterson, 2000; Xiao *et al.*, 2000; Siebert & Puchta, 2002; Orel *et al.*, 2003). Abhängig von der Sequenz des betrachteten Locus können zwei Mechanismen der DSBR unterschieden werden. In einem Falle kommt es zum Verlust von Sequenz-Information zwischen zwei identischen Sequenzen gleicher Orientierung (SSA-Modell; Lin *et al.*, 1984 & 1990) und im anderen erfolgt eine Genkonversion (SDSA-Modell, Fishman-Lobell *et al.*, 1992).

Bereits 1991 beschrieben Athma & Peterson, dass die Transposition des *Ac*-Elementes im *P* Gen von Mais die intrachromosomale HR induziert und zu einer Destabilisierung flankierender identischer Sequenzen gleicher Orientierung durch Deletionen führt, was sich durch den oben diskutierten SSA-Mechanismus erklären lässt. Ebenfalls mit diesem Mechanismus lassen sich Ergebnisse der Studie von Xiao & Peterson (2000) erklären, die zeigten, dass die *Ac*-vermittelte Transposition des *Ds*-Elementes aus Mais aus einem transgenen Reporterkonstrukt zwischen zwei homologen Sequenzen identischer Orientierung die homologe Rekombination um drei Größenordnungen steigert. Xiao *et al.* (2000) untersuchten ebenfalls die intrachromosomale Rekombination mit Hilfe des *Ac*-Transposons am *P1* Gen in Mais. Hierbei wurden sowohl Position als auch Orientierung des *Ac*-Elementes zwischen zwei 5,2 kb umfassenden Sequenz-Homologien identischer Orientierung verändert. In dieser Studie wurde gefunden, dass die HR-Frequenz signifikant höher ist, wenn *Ac* zwischen den beiden Sequenzwiederholungen liegt als bei einer Lokalisation innerhalb einer der beiden Sequenz-Homologien oder außerhalb der zueinander homologen Bereiche. Die Orientierung des *Ac*-Transposons hatte jedoch keinen Effekt auf die Zunahme der HR-Frequenz (Xiao *et al.*, 2000). Auf Grund dieser Befunde ist davon auszugehen, dass die Transposon-induzierte Rekombination in hochrepetitiven Pflanzengenomen zu erheblichen Genomveränderungen in evolutionären Zeiträumen führt und damit eine Triebkraft für die Genomevolution darstellt.

Chiruzzi *et al.* (1996) konnten in *Arabidopsis* durch Expression der HO-Endonuklease aus Hefe (Kostriken *et al.*, 1983 & 1984; Nickoloff *et al.*, 1986) in einem Transgenkonstrukt mit zwei invers zueinander orientierten Sequenz-Homologien einen ortsspezifischen DSB induzieren und fanden eine Steigerung der HR-Frequenz um den Faktor 10. Auf Grund der inversen Orientierung der Sequenz-

Homologien konnte eine DSB-Reparatur durch den SSA-Mechanismus ausgeschlossen werden und der Bruch musste durch den SDSA-Mechanismus der HR repariert worden sein.

Um die relative Effizienz dieser beiden DSBR-Wege abschätzen zu können, verwendeten Orel *et al.* (2003) in *Arabidopsis* transgene Rekombinationssubstrate mit nicht-funktionellen Reportergenen in verschiedener Orientierung zueinander, in welchen durch die Meganuklease I-SceI ortsspezifisch DSBs induziert werden konnten. Nach dem SDSA-Modell hat die Orientierung der Donorsequenz zum DSB keinerlei Einfluss auf die Genkonversion, wenn innerhalb einer Homologie-Region ein DSB auftritt. Im Gegensatz dazu sollte zur Untersuchung des SSA-Weges der DSB zwischen zwei in gleicher Orientierung zueinander liegenden Sequenzhomologien auftreten. Bei diesen Untersuchungen wurde gefunden, dass die DSB-Reparatur über den SSA-Weg etwa fünfmal effizienter abläuft als über den SDSA-Mechanismus (Orel *et al.*, 2003). Diese Studie erlaubte damit erstmals einen quantitativen Vergleich der Verwendung dieser beiden Reparaturwege *in vivo*.

Das in der Studie von Orel *et al.* (2003) verwendete System war allerdings auf die Detektion von HR-Ereignissen limitiert. In einer weiteren Untersuchung, bei der neben HR-Ereignissen auch NHEJ-Ereignisse regeneriert und analysiert werden konnten, wurde daher getestet, wie ein DSB *in vivo* repariert wird, wenn nahe des Bruches zueinander homologe Sequenzen vorhanden sind. Hierzu wurde durch I-SceI-Expression *in vivo* aus einem transgenen Rekombinationssubstrat ein negativer Selektionmarker herausgeschnitten. Angrenzend an die Bruchenden waren nicht-funktionelle Teile des β -Glucuronidase-Reportergens mit einer 557 bp umfassenden Sequenzhomologie zueinander lokalisiert. Der resultierende DSB konnte entweder durch NHEJ (Verlust des negativen Selektionsmarkers) oder durch HR (Verlust des negativen Selektionsmarkers und Blaufärbung) detektiert werden. Dabei konnten Siebert & Puchta (2002) zeigen, dass einer von drei DSBs durch SSA repariert wird. Dies deckt sich mit Daten der oben diskutierten Arbeit von Xiao & Peterson (2000). Folglich ist der SSA-Mechanismus ein sehr effizienter Weg zur Reparatur von DSBs durch intrachromosomale HR.

Zusammengenommen ergeben die hier diskutierten Arbeiten ein recht detailliertes Bild vom Ablauf der Doppelstrangbruch-Reparatur über homologe

Rekombination in somatischen Pflanzenzellen. Sind Homologien nahe eines DSBs vorhanden, kann die Reparatur in bis zu 30 % der Fälle durch SSA erfolgen. In einem von 15 Fällen findet man hierbei auch SDSA-vermittelte DSB-Reparatur. Damit ist die intrachromosomale somatische HR um 100 bis 1000 mal effizienter als Genkonversionen mit ektopischen oder allelischen Sequenzen. Folglich können solche HR-vermittelten Rekombinations-Ereignisse in der genetischen Information somatischer Pflanzenzellen fixiert werden und auf Grund der erst spät determinierten Keimbahn zur Genom-Evolution in Pflanzen beitragen. Da sich somatische Genomveränderungen zunächst auf zellulärer Ebene bewähren müssen, um Eingang in die Keimbahn zu finden, besteht für Pflanzen eine zusätzliche Möglichkeit zur Evolution vorteilhafter Genomsequenzen (Walbot, 1985).

So kann die DSB-Reparatur zwischen Tandem-artig organisierten Genfamilien, wie z.B. Resistenzgen-Clustern, durch Rekombination zu neuen Resistenzen führen und damit zu einem Selektionsvorteil beitragen (Richter *et al.*, 1995; Parniske *et al.*, 1997; Parniske & Jones, 1999; Ramakrishna *et al.*, 2002; Leister, 2004; Wulff *et al.*, 2004; Übersicht in: Friedman & Baker, 2007). Solche Ereignisse müssen also nicht notwendigerweise während der Meiose erfolgen, sondern können auch in somatischem Pflanzengewebe auftreten. Dass dies der Fall ist, konnten u. a. Lucht *et al.* (2002) zeigen. In diesem Zusammenhang erscheint es zudem sinnvoll, dass es in somatischen Pflanzenzellen zu einer Induktion der HR durch Konfrontation mit biotischen oder abiotischen Stressfaktoren kommt (Puchta *et al.*, 1995, Kovalchuk *et al.*, 1998, 1999, 2000; 2001a, b & 2003; Ries *et al.*, 2000a, b). Molinier *et al.* (2006) konnten bei *Arabidopsis* sogar zeigen, dass selbst bei unbehandelten Nachkommen von Pflanzen, welche einer genotoxischen Stress-Situation ausgesetzt wurden, die HR erheblich hochreguliert ist. Dieses Phänomen wurde als „Trans-Generationen-Gedächtnis für Stress“ beschrieben und in Hinblick auf ein gesteigertes Adaptations-Potenzial diskutiert (Molinier *et al.*, 2006).

Die somatische homologe Rekombination muss also sehr stringent reguliert sein, um die Genomstabilität einerseits zu wahren und eine Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umweltbedingungen zu gewährleisten. Aus diesem Grunde überrascht es nicht, dass in Organismen mit großen Genomen und vielen repetitiven Sequenzen NHEJ der vorherrschende DSB-Reparaturweg ist.

1.4.6 DSB-Reparatur durch Non-Homologous End-Joining

In verschiedenen Untersuchungen zum NHEJ in Pflanzen wurden Sequenzen an Loci analysiert, aus welchen Transposons herausgeschnitten worden waren (Saedler & Nevers, 1985; Baran *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1996). Hierbei wurden neben kleineren Deletionen auch Sequenz-Insertionen und Inversionen gefunden. Allerdings werden diese Ergebnisse nicht als repräsentativ für NHEJ in Pflanzen erachtet, da möglicherweise Transpositions-spezifische Proteine beim Schutz des DSBs bzw. dessen Reparatur beteiligt sind. Insofern sind Daten, die auf Analysen von natürlich auftretenden Rekombinationen basieren, sicherlich aussagekräftiger.

Wessler *et al.* (1990) fanden bei der Analyse fünf spontaner Mutationen im *waxy* Gen von Mais Deletionen zwischen 60 und 980 Nukleotiden Länge. Innerhalb dieser Deletionen wurden „Filler“-Sequenzen von einem bis 131 Nukleotiden detektiert. In drei Fällen konnte deren Herkunft auf nahe an die Deletionsstelle angrenzende Bereiche zurückgeführt werden. Auch im Falle einer von Ralston *et al.* (1988) untersuchten spontanen Deletion im *bz-R* Allel von *Zea mays* wurde ebenfalls „Filler-DNA“ gefunden. Diese Befunde werden durch Studien von induzierten Mutationen im *Arabidopsis*-Genom gestützt, welche durch ionisierende Strahlung hervorgerufen wurden (Shirley *et al.*, 1992).

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse von NHEJ *in planta* ist die Untersuchung von T-DNA-Integrations-Ereignissen ins Pflanzengenom. In den meisten Fällen wurde hierbei das Auftreten von Mikrohomologien an den Verknüpfungsstellen, Deletionen sowie das Vorhandensein von „Filler-DNA“ zwischen den Border-Sequenzen und den benachbarten genomischen Sequenzen beschrieben (Übersicht in: Tinland, 1996).

Ebenfalls bei Arbeiten zum NHEJ in Pflanzen fanden Salomon & Puchta (1998) in Tabak nach I-SceI-vermittelter DSB-Induktion zahlreiche Insertionen genomischer Sequenzen in den Bruch. Es wurden zwei unterschiedliche Klassen von rekombinanten Ereignissen gefunden: in einem Fall traten einfache Deletionen unterschiedlicher Größe auf, welche teilweise von der Insertion kurzer Filler-Sequenzen begleitet wurden. Daneben wurden auch Insertionen größerer Sequenzen – darunter auch vollständige T-DNAs – in den Bruch gefunden. Dies ist

insofern von Bedeutung, als dass damit eine Möglichkeit zur gerichteten Transgen-Integration offen steht. Dies ist *per se* keine Überraschung, da generell bei stabilen genetischen Transformationen Transgen-Enden von fremden DNAs mit dem Genom verknüpft werden. So wurde bereits früher beschrieben, dass Röntgenstrahlung die Transformationsfrequenz bei Tabak signifikant erhöht (Köhler *et al.*, 1989).

Im Gegensatz zu den für Pflanzen gefundenen Ergebnissen wird bei Hefe nur cDNA oder mtDNA in den DSB kopiert (Moore & Haber, 1996; Teng *et al.*, 1996; Ricchetti *et al.*, 1999). Generell ist das Auftreten solcher großen „Filler“-Sequenzen bei der DSB-Reparatur durch NHEJ in Säugern oder Bakterien sehr selten und scheint ein Pflanzen-spezifisches Merkmal des NHEJ zu sein (Gorbunova & Levy, 1999).

Da in der oben beschriebenen Studie zwischen den in den Tabak-DSB inserierten Sequenzen (subtelomerische Sequenzen, retrotransposonähnliche Sequenzen, aber auch unikale aus anderen Genombereichen) und den DSB-Enden kurze Homologien auftraten, wurde ein SDSA-Mechanismus vorgeschlagen, durch welchen die ektopische Sequenz in den Bruch kopiert werden würde (Abbildung 1.9, siehe auch: Kapitel 1.4.1.1). In den meisten Fällen kam es dabei zur Invasion nur eines der beiden 3'-Enden (Salomon & Puchta, 1998). Sequenzen unterschiedlicher Herkunft (Gorbunova & Levy, 1997) können allerdings nur durch die unabhängige Invasion beider Enden erklärt werden. Diese Beobachtung könnte ebenfalls von Bedeutung für die Evolution von Pflanzengenomen sein.

Auf diese Weise können Sequenz-Duplikationen und Insertionen das Genom vergrößern, während Deletionen es verkleinern. In diesem Zusammenhang wurde die Spezies-spezifische Verbreitung von Retro-Elementen als Hauptmechanismus der Genomvergrößerung in Pflanzen diskutiert (SanMiguel *et al.*, 1996, 1998; Bennetzen & Kellog, 1997). Deletionen könnten hierbei das Gegengewicht darstellen (Petrov *et al.*, 1996 & 2000; Petrov, 2001 & 2002; Oliver *et al.*, 2007; Überblick in: Cavalier-Smith, 2005). Würden die durch Aktivität mobiler genetischer Elemente hervorgerufenen DSBs in bestimmten Pflanzen-Spezies vorzugsweise durch Deletionen einhergehend mit Sequenz-Insertionen repariert, würden entsprechende Genome wachsen, solange dies energetisch tolerierbar ist. Diese Vergrößerung von

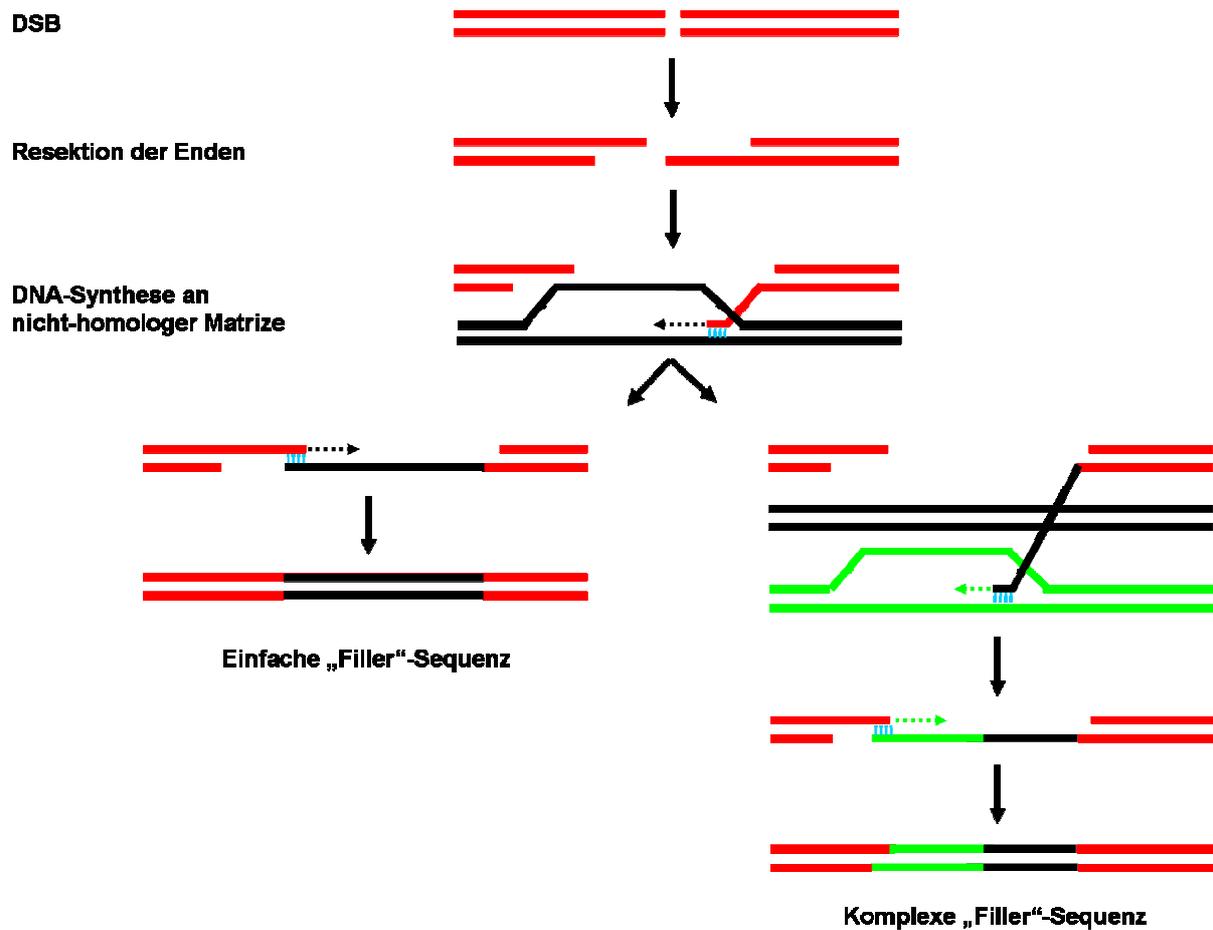


Abbildung 1.9. Herkunft von „Filler“-DNA bei der DSB-Reparatur durch NHEJ. Nach diesem an das SDSA-Modell angelehnten Mechanismus invadiert ein überhängendes 3'-Ende über Mikrohomologien in einen nicht-homologen Donor-Duplex. Nach dem Kopieren eines Teils dieser Sequenz wird die DNA-Synthese beendet und die Bruchenden miteinander verknüpft. Mit diesem Modell lassen sich einfache „Filler“-Sequenzen erklären. Eine erneute Stranginvasion und DNA-Synthese an anderer Stelle („Template Switching“) kann auch komplexere Muster von „Filler“-Sequenzen erklären. Auch die unabhängige Interaktion beider DSB-Enden mit verschiedenen Donor-Sequenzen kann zum Auftreten komplexer Sequenz-Insertionen in den Bruch führen (nach Gorbunova & Levy, 1997; verändert).

Genomen böte außerdem die Möglichkeit zur Entstehung neuer Gene aus Duplikaten vorhandener Sequenzen (Ohno, 1970). Würden im gegenteiligen Falle bei einer Spezies DSB-Reparatur-Ereignisse durch NHEJ vorzugsweise mit Deletionen korreliert sein, würde im evolutionären Zeitmaßstab die Genomgröße abnehmen (Petrov, 1997).

Um diese Hypothese zu überprüfen, führten Kirik *et al.* (2000) vergleichende Untersuchungen zur Prozessierung von DSBs durch NHEJ in somatischem Gewebe von Tabak und *Arabidopsis* durch. Die Genomgröße beider Pflanzen-Spezies

unterscheidet sich um den Faktor 20 (Bennett & Leitch, 1997). Für diese Studien wurde von Kirik *et al.* (2000) ein transgenes Rekombinationssubstrat verwendet, welches einen negativen Selektionsmarker und eine Erkennungssequenz für die Meganuklease I-SceI enthielt. Nach *in vivo* Induktion von DSBs konnten ausschließlich Ereignisse regeneriert und analysiert werden, bei denen die Prozessierung der Bruchenden zu einer Inaktivierung des negativen Selektionsmarkers geführt hatten. In der Tat wurden erhebliche Unterschiede bei der DSB-Reparatur in diesen beiden Spezies beschrieben – die Verknüpfungsarten zwischen den DSB-Enden unterschieden sich jedoch nicht. Bei Tabak traten bei etwa 50 % der Deletionen gleichzeitig Insertionen auf, wogegen bei *Arabidopsis* keinerlei Insertionen beobachtet wurden. Generell waren dabei die Deletionen in Tabak um 30 % kürzer als in *Arabidopsis*. Dies kann, wie Petrov (2002) es für Insekten postuliert hatte, als inverse Korrelation zwischen Genomgröße und mittlerer Länge der detektierten Deletionen verstanden werden.

Da in *Arabidopsis* segmentale Duplikationen oder sogar eine vollständige Genomduplikation im Laufe der Evolution stattgefunden hat (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), kann das sehr kleine Genom der heute bekannten Art nur durch den Beitrag erheblicher Deletionen über evolutionäre Zeiträume erklärt werden. Simulationen bezüglich des Verlustes von LTRs von Retroelementen bestätigen dies (Devos *et al.*, 2002).

Wie können diese Spezies-spezifischen Unterschiede zwischen Tabak und *Arabidopsis* erklärt werden? Werden die DSB-Enden nicht unmittelbar ligiert, kommt es zu einer Prozessierung der Enden. Abhängig von der Effizienz dieses Vorgangs werden Sequenzen unterschiedlicher Größe degradiert. Dies wurde von Orel & Puchta (2003) dadurch getestet, dass linearisierte Plasmide mit Hilfe einer Partikelkanone in Tabak und *Arabidopsis* eingebracht wurden. Diese Plasmide waren durch Restriktionsspaltung („*in vitro* DSB“) zwischen Promotor und Reporter gen linearisiert worden. Eine Expression des Reporter gens konnte also nur nach erfolgter Reparatur des DSBs auftreten. Als interne Kontrolle dienten hierbei Plasmide, bei denen der DSB mehr als 2 kb vom Reporter gen entfernt lag. In *Arabidopsis* wurde die Expression des Reporter gens nur in halb so vielen Fällen wie für Tabak gefunden, wogegen in den Kontroll-Experimenten gleiche Expressionsraten des

Reportergens für beide Spezies gefunden wurden. Eine unterschiedliche endonukleolytische Aktivität zwischen den Spezies konnte daher ausgeschlossen werden. Die gefundenen Daten ließen *per se* zunächst keine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen exonukleolytischen Prozessierungen oder verschiedenen Ligations-Effizienzen zwischen den Spezies zu. Mit Hilfe von Southern Blot-Analysen konnten Orel & Puchta (2003) jedoch zeigen, dass diese Spezies-spezifischen Unterschiede auf verschiedene exonukleolytischen Prozessierungen der DSB-Enden zurück zu führen sind. Dies kann zum einen durch die unterschiedliche Aktivität der Exonukleasen aber auch durch Unterschiede im Schutz der DNA-Enden begründet sein (Liang *et al.*, 1996).

Die diskutierten Arbeiten zeigen, dass ein spezifisches Charakteristikum der DSB-Reparatur durch NHEJ in somatischen Pflanzenzellen die Insertion von „Filler“-Sequenzen ist. Diese können am Besten mit Hilfe des in Abbildung 1.9 dargestellten SDSA-ähnlichen Mechanismus erklärt werden. Unter Berücksichtigung der Erkenntnis, dass die beiden Enden eines DSBs unabhängig voneinander in Reparaturprozesse involviert sein können (Puchta, 1998), lassen sich auch komplexe „Filler“-Sequenzen erklären (Übersicht in: Gorbunova & Levy, 1999). Dies zeigt, dass die Übergänge zwischen HR und NHEJ bisweilen fließend sind und im Falle von SDSA abhängig von der verwendeten Matrize bzw. bei einem SSA-ähnlichen Vorgang unter Verwendung von Mikro-Homologien Bruchenden über nicht-homologe Rekombination miteinander verknüpft werden können.

Das Vorherrschen des NHEJ in somatischen Zellen schützt so vor möglicherweise fatalen Rekombinations-Ereignissen zwischen den häufigen hochrepetitiven Sequenzen des Pflanzengenoms einerseits und toleriert andererseits kleinere Sequenzveränderungen durch Deletionen und Insertionen, welche die Plastizität des Genoms erhöhen und ebenfalls eine Triebkraft zur Genomevolution darstellen können.

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte erstmals die Fragestellung beantwortet werden, wie zwei gleichzeitig auftretende nicht gekoppelte DSBs im Genom somatischer Pflanzenzellen repariert werden. Hierzu sollte ein experimentelles System in Tabak etabliert werden, bei welchem durch Expression der Meganuklease I-SceI *in vivo* zwei simultane Doppelstrangbrüche induziert werden können. Die Konzeption des experimentellen Systems sollte dabei die Selektion von Translokations-Ereignissen sowohl durch HR als auch durch NHEJ erlauben, um anschließend das Rekombinationsverhalten der Enden molekular-genetisch untersuchen zu können. Beim Auftreten solcher Translokations-Ereignisse sollten rekombinante Pflanzen regeneriert und hinsichtlich reziproker Translokationen untersucht werden. Diese sollten einer detaillierten molekulargenetischen Charakterisierung unterzogen werden. Zudem sollte analysiert werden, ob auf solche Translokationen zurück zu führende Genomveränderungen über die Keimbahn an die folgenden Generationen weitergegeben und normal segregieren würden.

Obwohl NHEJ in somatischen Pflanzenzellen den vorherrschenden Mechanismus zur Reparatur von DSBs darstellt, ist bis heute kein System beschrieben worden, welches eine Quantifizierung des NHEJ im somatischen Pflanzengewebe *in vivo* erlaubt. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, ein experimentelles System in *Arabidopsis* zu etablieren, welches eine *in vivo* Quantifizierung von NHEJ-Ereignissen ermöglicht. Das dafür erforderliche Rekombinationssubstrat sollte kloniert und stabil in *Arabidopsis* transformiert werden. Anschließend sollten für dieses System homozygote Linien etabliert und diese eingehend molekulargenetisch hinsichtlich eines vollständigen und funktionsfähig integrierten Reporterkonstruktes charakterisiert werden. Anschließend sollte eine Bestimmung der Insertions-Loci der Rekombinationssubstrate erfolgen, um für spätere Arbeiten eine PCR-basierte Genotypisierung zu ermöglichen. Schlussendlich sollte gezeigt werden, dass durch Expression von I-SceI *in vivo* DSBs in den transgenen Linien erzeugt und ihre Reparatur durch NHEJ quantitativ nachgewiesen werden kann. Abschließend sollten auf die induzierten DSBs zurück zu führende Rekombinations-Ereignisse sequenziert und analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Standard-Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl ROTH GmbH (Karlsruhe), DUCHEFA (Haarlem, Niederlande), Fluka AG (Buchs), GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg), Merck (Darmstadt), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) in der Regel *p.a.* Qualität bezogen. Die Bezugsquellen für Antibiotika, Pflanzenhormone und Herbizide sind Tabelle 2.2 zu entnehmen.

- α -³²P-dCTP (GE Healthcare, Freiburg)
- Acetosyringon (Carl ROTH GmbH, Karlsruhe)
- dNTP-Gemisch 10 mM (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot)
- GeneRuler™ 1kb DNA-Leiter (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot)
- Micro Agar (DUCHEFA, Haarlem, Niederlande)
- Murashige & Skoog Medium mit Vitaminen und MES-Puffer (DUCHEFA, Haarlem, Niederlande, Best.-Nr.: 0225.0050)
- Murashige & Skoog Medium mit Vitaminen (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Best.-Nr.: 47515.04)
- Plant Agar (DUCHEFA, Haarlem, Niederlande)
- Salmon – Sperm DNA (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, Texas, USA)
- Spermidin (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- X-GlcA, Cyclohexylammonium (DUCHEFA, Haarlem, Niederlande)

2.2 Lösungen und Puffer

2.2.1 DNA-Isolierung

- DNA-Extraktionspuffer:

63,76	g/l	Sorbitol
12,11	g/l	Tris
1,86	g/l	EDTA
		pH 7,5 (mit konzentrierter HCl)

- Nuclei-Lysis-Puffer:

24,22	g/l	Tris
18,61	g/l	EDTA
116,88	g/l	NaCl
20	g/l	CTAB
		pH 8,0 (mit HCl)

- 5 % Sarkosyllösung:

50	g/l	Sarkosyl
----	-----	----------

- Isolierungspuffer (40 ml):

333	mg	Natriumdisulfit in 3,3 ml ddH ₂ O
18	ml	DNA-Extraktionspuffer
18	ml	Nuclei-Lysis-Puffer
3,7	ml	5 % Sarkosyllösung

- Shorty-Extraktionspuffer:

0,2	M	Tris
0,4	M	LiCl
25	mM	EDTA
1	%	SDS
		pH 9,0 (mit HCl)

- TE-Puffer:

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
	pH 8,0 (mit HCl)

2.2.2 Histochemische Färbung

- 100 mM Phosphatpuffer:

17,8 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	pH 7,0 (mit H ₃ PO ₄)
- 1 % X-GlcA:

100 mg	X-GlcA in 10 ml DMF
--------	---------------------
- 5 % Na-Azid:

500 mg	Na-Azid in 10 ml ddH ₂ O
--------	-------------------------------------
- X-GlcA-Färbelösung (50 ml):

46,5 ml	100 mM Phosphatpuffer
2,5 ml	1 % X-GlcA-Lösung
1 ml	5 % Na-Azid-Lösung

2.2.3 Southern Blotting

- Na-Acetat 3 M:

	pH 5,2
--	--------
- Spermidin-Lösung:

100 mM	in 100 mM Tris, pH6,8 (mit HCl)
--------	---------------------------------
- 20x SSC-Transferpuffer:

175,5 g/l	NaCl
88,2 g/l	Na-Citrat
	pH 7,0 (mit HCl)
- 2x SSC-Transferpuffer:

100 ml/l	20x SSC-Puffer
----------	----------------

- Denaturierungspuffer:

87,66	g/l	NaCl
20	g/l	NaOH

- Hybridisierungspuffer:

100	ml/l	100 mM Phosphatpuffer (siehe 2.2.2)
62,9	g/l	SDS
10	g/l	BSA
2	ml	denaturierte "Salmon-Sperm" DNA

- Neutralisierungspuffer:

60,56	g/l	Tris
87,66	g/l	NaCl
		pH 7,0 (mit konzentrierter HCl)

- 1 % SDS-Lösung:

10	g/l	SDS
----	-----	-----

- Waschlösung I:

100	ml/l	20x SSC-Transferpuffer
5	g/l	SDS

- Waschlösung II:

5	ml/l	20x SSC-Transferpuffer
100	ml/l	1 % SDS-Lösung

2.3 Enzyme

2.3.1 DNA-Polymerasen

Alle Polymerasen wurden mit dem mitgelieferten Puffer nach Herstellerangaben eingesetzt.

- Taq DNA-Polymerase [5 U/μl] (Biomaster GmbH, Windeck)
- Ex-Taq™ DNA-Polymerase [5 U/μl] (TaKaRa Bio Inc., Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
- Phusion-DNA-Polymerase [2 U/μl] (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

- Klenow-Enzym [1 U/μl] (GE Healthcare, Freiburg)

2.3.2 Restriktionsenzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben mit dem mitgelieferten Puffer eingesetzt.

- *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *NotI* (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot)
- *BglII*, *BsaXI*, *I-SceI*, *KpnI* (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

2.3.3 Nukleasen, Ligasen

Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben mit dem mitgelieferten Puffer eingesetzt.

- RibonukleaseA, RNase [90 Kunitz-U / mg], Stammlösung: 2 mg/ml (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Antarctic Phosphatase [5 U/μl] (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- T4-Ligase [5 U/μl] (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot)

2.4 Plasmide

Tabelle 2.1: Plasmide. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der Tabelle zusammengestellt.

Plasmid	Marker (Bakterien)	Marker (Pflanzen)	Quelle
pTS	Gentamycin	Hygromycin	Prof. Puchta
pTL	Gentamycin	PPT	Prof. Puchta
pI-SceI	Ampicillin		Prof. Puchta
pAR-I-SceI	Kanamycin	Kanamycin	Prof. Puchta
p(UC)PCBR	Ampicillin		Prof. Puchta
pCAH5	Ampicillin		Prof. Puchta
pGUS23	Ampicillin		Puchta & Hohn, 1991a; Schultze <i>et al.</i> , 1990
pPZP121	Chloramphenicol	Gentamycin	Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994
pPZP111	Chloramphenicol	Kanamycin	Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994
pMP1	Chloramphenicol		Klonierung
pNHEJ	Chloramphenicol	Gentamycin, Kanamycin	Klonierung
pBluescript SK+	Ampicillin		Prof. Puchta
pGEM®-T	Ampicillin		Promega GmbH (Mannheim)

2.5 Primer

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer (siehe Tabelle 8.1 im Anhang) wurden von der Firma Metabion (metabion international AG, Martinsried) bezogen.

2.6 Medien

Alle Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Medien-Zusätze (Antibiotika, Herbizide, Hormone) wurden sterilfiltriert, sofern Wasser als Lösungsmittel diente (siehe Tabelle 2.2).

2.6.1 Bakterienkultur

- *E.coli*:

<u>LB-Medium</u>	
10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefe-Extrakt
10 g/l	NaCl
	pH 7,0 (mit NaOH)
17,5 g/l	Micro-Agar (für Festmedien)

- *Agrobacterium*:

<u>YEB-Medium</u>	
5 g/l	Beef-Extrakt
5 g/L	Pepton
1 g/L	Hefe-Extrakt
5 g/L	Saccharose
493 mg/L	MgSO ₄
12 g/L	Micro-Agar (für Festmedien)

2.6.2 Pflanzen-Anzucht

- *Arabidopsis thaliana*:

<u>GM-Medium</u>	
4,9 g/l	Murashige & Skoog-Medium (DUCHEFA)
10 g/l	Saccharose
	pH 5,7 (mit KOH)
8 g/l	Plant Agar (für Festmedien)

- *Nicotiana tabacum*:

<u>MS-Medium</u>	
4,62 g/l	Murashige & Skoog-Medium (SERVA)
30 g/l	Saccharose
	pH 5,7 (mit KOH)
8 g/l	Plant Agar (für Festmedien)

MSH-Medium

4,62 g/l	Murashige & Skoog-Medium (SERVA)
30 g/l	Saccharose
	pH 5,7 (mit KOH)
8 g/l	Plant Agar (für Festmedien)
5 mg/l	Benzylaminopurin (Tabelle 2.2)
0,5mg/l	Naphtylessigsäure (Tabelle 2.2)

MSH-Selektions-Medium

4,62 g/l	Murashige & Skoog-Medium (SERVA)
30 g/l	Saccharose
	pH 5,7 (mit KOH)
8 g/l	Plant Agar (für Festmedien)
5 mg/l	Benzylaminopurin (Tabelle 2.2)
0,5 mg/l	Naphtylessigsäure (Tabelle 2.2)
200 mg/l	Ticarcillin (s. Tabelle 2.2)
	bzw. statt Ticarcillin:
250 mg/l	Cefotaxim (s. Tabelle 2.2) und
200 mg/l	Vancomycin (s. Tabelle 2.2)

Tabelle 2.2: Medienzusätze. LM: Lösungsmittel. Ticarcillin wird zur Selektion gegen Agrobakterien verwendet und kann durch eine Kombination aus Cefotaxim und Vancomycin ersetzt werden.

Antibiotikum / Zusatz	LM	C (Stock)	<i>E.coli</i>	<i>Agrobacterium</i>	Tabak	<i>Arabidopsis</i>
Ampicillin ⁽¹⁾	H ₂ O	100 mg/ml	100 mg/l			
BAP (Benzylaminopurin) ⁽²⁾	H ₂ O	1 mg/ml			5 mg/l	
Carbenicillin ⁽²⁾	H ₂ O	50 mg/ml	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l
Cefotaxim ⁽²⁾	H ₂ O	250 mg/ml			500 mg/l	500 mg/l
Chloramphenicol ⁽²⁾	EtOH	50 mg/ml	50 mg/l			
Gentamycin ⁽²⁾	H ₂ O	100 mg/ml	20 mg/l	20 mg/l	80 mg/l	60 mg/l
Hygromycin ⁽²⁾	H ₂ O	50 mg/ml	50 mg/l	25 mg/l	40 mg/l	10 mg/l
Kanamycin ⁽¹⁾	H ₂ O	100 mg/ml	100 mg/l	25 mg/l	50 mg/l	30 mg/l
NAA (Naphtylessigsäure) ⁽²⁾	NaOH (1 N)	1 mg/ml			0,5 mg/l	
PPT (DL-Phosphinothricin) ⁽²⁾	H ₂ O	20 mg/ml			7 mg/l	6 mg/l
Rifampicin ⁽²⁾	DMSO	100 mg/ml		100 mg/l		
Spectinomycin ⁽²⁾	H ₂ O	100 mg/ml	100 mg/l	100 mg/l		
Ticarcillin ⁽²⁾	H ₂ O	150 mg/ml			300 mg/l	250 mg/l
Vancomycin ⁽²⁾	H ₂ O	200 mg/ml			200 mg/l	200 mg/l

DMSO=Dimethylsulfoxid

Bezugsquellen:

(1) Carl ROTH GmbH, Karlsruhe

(2) DUCHEFA, Haarlem, Niederlande

2.6.3 Pflanzen-Transformation

- *Arabidopsis thaliana*: Infiltrationsmedium-Medium (800 ml)

2 g	Murashige & Skoog-Medium (DUCHEFA)
40 g/l	Saccharose
3,4 µl	Benzylaminopurin (Tabelle 2.2)
800 µl	Acetosyringon
	pH 5,7 (mit KOH)
400 µl	Silwet L-77

- *Nicotiana tabacum*: Infiltrationsmedium-Medium (800 ml)

10 mM	MgSO ₄ (autoklaviert)
-------	----------------------------------

2.7 Kits und Verbrauchsmaterial

- DNA-Aufreinigung / Gel-Extraktion:
High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Grenzach Wyhlen)
- Plasmid-Präparation:
QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- Southern Blotting:
Megaprime™ DNA Labelling Systems Kit RPN1607 (GE Healthcare, Freiburg)
Nytran SPC TurboBlotter Kit 200 x 250 Katalog-Nr. 10416324 (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel)

2.8 Geräte und Apparaturen

2.8.1 Southern Blotting

- S&S TurboBlotter and Blotting Stack Assembly for Alkaline and Neutral Transfer (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel)
- Nylon-Transfermembran "Hybond N+" (GE Healthcare, Freiburg)
- BAS-Cassetten 2040 (FUJIFILM, Tokyo, Japan)
- Imaging Plate 20x40 (FUJIFILM, Tokyo, Japan)
- Bio-Imaging-Analyser BAS-1500 (FUJIFILM, Tokyo, Japan)
- Instant-Imager (Canberra-Packard GmbH, Dreieich)

2.8.2 Pflanzenanzucht

- Anzuchtschrank PERCIVAL CU-36L (CLF Laborgeräte GmbH, Emersacker)

2.9 Spezielle Software und Datenbanken

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)
- DNASTAR 5.03 (DNASTAR Inc., Madison, USA)
- GATCViewer™ (GATC Biotech AG, Konstanz)
- NCBI – National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- SIGnAL – SALK Institute Genome Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>)
- TAIR – The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>)
- TIGR – The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org>)

2.10 Versuchs-Organismen

2.10.1 Pflanzen

- *Arabidopsis thaliana* L. Heynhold, Ökotyp Columbia (Rédei, 1962)
- *Nicotiana tabacum* L. cv. Petite Havana SRI (Maliga *et al.*, 1973)

2.10.2 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DH5 α (Grant *et al.*, 1990)
- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) (Koncz *et al.*, 1984)
- *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 (pTiBo542 Δ T-DNA) (Lazo *et al.*, 1991)

2.11 Mikrobiologische Arbeiten

2.11.1 Transformation und Kultur von *E. coli*

Hitzekompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 – 10 μ l Ligations-Ansatz oder Plasmid-DNA gemischt und für etwa 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen, gefolgt von einer erneuten Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Danach wurden 400 μ l LB-Medium zugegeben und die Zellsuspension bei 37 °C / 750 rpm inkubiert (Eppendorf Thermomixer compact). Anschließend wurden 100 μ l eines Transformations-Ansatzes auf LB-Platten mit dem erforderlichen Selektions-

Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur weiteren Kultur wurde LB-Medium mit dem erforderlichen Selektions-Antibiotikum versetzt, mit einer Kolonie beimpft und bei 37 °C / 200 rpm für 12 – 16 Stunden inkubiert.

2.11.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Elektrokompetente Agrobakterien-Stämme wurden auf Eis aufgetaut und anschließend in eine ebenfalls auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Nach Zugabe von 1-5 µl des zu transformierenden Plasmids wurde die Küvette in das Elektroporationsgerät eingespannt. Die Elektroporation erfolgte mit folgenden Geräteeinstellungen (2,5 kV / 200 Ω / 5 ms). Anschließend wurden auf Eis 500 µl YEB-Medium mit den Zellen gemischt und die Zellsuspension für eine Stunde bei 28 °C / 750 rpm (Eppendorf Thermomixer compact) inkubiert. 100 µl eines Transformations-Ansatzes auf YEB-Platten mit den erforderlichen Selektions-Antibiotika ausplattiert und bei 28 °C über für 1-2 Tage inkubiert. Zur weiteren Kultur wurde YEB-Medium mit den erforderlichen Selektions-Antibiotika versetzt, mit einer Kolonie beimpft und bei 28 °C / 200 rpm für 12 – 16 Stunden inkubiert.

2.12 Pflanzen-Anzucht

2.12.1 Lagerung von Saatgut

Generell wurde das Saatgut von *Arabidopsis* und Tabak bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

2.12.2 *Arabidopsis thaliana*

Zur Pflanzen-Anzucht unter axenischen Bedingungen wurden *Arabidopsis*-Samen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und einer Oberflächensterilisation unterzogen. Hierzu wurden die Samen zunächst in 70 %-igem unvergällten Ethanol aufgenommen, welches unverzüglich nach einer kurzen Zentrifugation (20 Sekunden, 600 g) entfernt wurde. Anschließend wurden die Samen in einer 4 %-igen NaOCl-Lösung mit wenig Tween-20 für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Eppendorf Thermomixer compact, 25 °C, 1400 rpm). Daraufhin wurden die Samen abzentrifugiert (30 Sekunden, 600 g) und die NaOCl-Lösung unter der Sterilbank entfernt. Anschließend wurden die Samen 6x für eine Minute mit sterilem ddH₂O gewaschen und dann in 1 ml 0,1 %-iger steriler Agarose-Lösung aufgenommen. Bis zur Aussaat am folgenden Tag wurden die Samen zur Stratifikation bei 4 °C gelagert.

Sollten Samen in der F₁-Generation auf das Vorhandensein eines Transgens getestet werden, wurden bis zu 3000 Samen in etwa 10 ml 0,1 %-iger steriler Agarose-Lösung aufgenommen und mit dieser auf große GM-Platten (15 cm Durchmesser) gegossen und durch Schwenken verteilt. Sollten Samen der F₂- oder F₃-Generation einer Segregationsanalyse unterzogen werden, erfolgte die Aussaat einzeln mit der Pipette unter axenischen Bedingungen. Die Petrischalen wurden für 2 – 4 Wochen im Anzuchtsraum inkubiert (24 °C, Tag/Nacht-Rhythmus mit 16 h Lichtphase, Quantenflussdichte 100 µM Quanten * m⁻²s⁻¹ PhAR).

Für eine Erdanzucht von *Arabidopsis*-Pflanzen im Gewächshaus wurden die Samen lediglich in 1 ml Leitungswasser aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Aussaat erfolgte durch das Personal des Botanischen Gartens. Hierzu wurden Samen mit einer Pipette einzeln auf Erde (1:1-Mischung aus Floraton 3 und Vermiculite, Körnung 2-3 mm) in 5x5 cm Töpfe ausgesät.

2.12.3 *Nicotiana tabacum*

Für eine Anzucht von Tabak unter keimfreien Bedingungen wurden Samen 2x in einer 6 %-igen NaOCl-Lösung mit etwas Tween-20 versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Eppendorf Thermomixer compact, 25 °C, 1400 rpm). Diese Lösung wurde unter axenischen Bedingungen abpipettiert. Anschließend wurden die Samen in 1 - 2 ml 1 %-iger steriler Agarose-Lösung aufgenommen und konnten sofort ausgesät werden. Die Aussaat erfolgte mit der Pipette auf MS-Medium in großen Petrischalen. Diese wurden für 2 – 4 Wochen im Anzuchtsraum inkubiert (24 °C, Tag/Nacht-Rhythmus mit 16 h Lichtphase, Quantenflussdichte 100 µM Quanten * m⁻²s⁻¹ PhAR).

Für eine Erdanzucht von Tabak-Pflanzen im Gewächshaus wurden die Samen vom Personal des Botanischen Gartens in Leitungswasser aufgenommen und mit einer Pipette einzeln auf Erde (1:1-Mischung aus Floraton 3 und Vermiculite, Körnung 2-3 mm) in 5x5 cm Töpfe ausgesät.

2.12.4 Kreuzungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Kreuzungen zwischen Tabak-Linien als auch zwischen *Arabidopsis*-Linien durchgeführt. Bei beiden Versuchsorganismen ist der Ablauf der Kreuzung der Gleiche. Alle geöffneten Blüten und zu junge Knospen wurden vom Blütenstand entfernt. Bei der Mutter-Pflanze wurden

geschlossene Knospen mit einer feinen Pinzette geöffnet und alle Blütenteile bis auf den Fruchtknoten behutsam entfernt. Von der Vater-Pflanze wurde eine geöffnete Blüte abgetrennt und deren Staubblätter vorsichtig über die Narbe des freigelegten Fruchtknotens der Mutter-Pflanze gestrichen. Somit wurde erreicht, dass nur die Pollen der Vater-Pflanze auf die Narbe der Mutter-Pflanze gelangten. Jeder auf diese Weise bestäubte Fruchtknoten wurde markiert und bis zur Samenreife stehen gelassen. Die Samen wurden geerntet, wenn die Schoten braun und trocken waren.

2.13 Pflanzen-Transformation

2.13.1 *Arabidopsis*-Transformation

Die stabile genetische Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte durch eine modifizierte Variante des von Clough & Bent (1998) beschriebenen „Floral Dip“-Protokolls. Hierzu wurden etwa 4 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen von geöffneten Blüten oder Schoten befreit und die Blütenstände für etwa 30 Sekunden in eine vorbereitete Agrobakterien-Suspension getaucht. Hierzu wurden zuvor 400 ml einer Agrobakterien-Übernachtskultur (OD_{600nm} ca. 1,8) durch Zentrifugation (15 Minuten, 4500rpm, 4 °C) pelletiert und anschließend in 800 ml Infiltrationsmedium (modifiziertes GM-Medium: 146 mM Saccharose) resuspendiert. Nach Zugabe des Cytokinins Benzylaminopurin (BAP, Endkonzentration: 18,9 nM) und des Induktors Acetosyringon (Endkonzentration: 0,51 μ M) wurde der pH-Wert des Mediums mit KOH auf 5,7 eingestellt und es wurden 400 μ l Silwet L-77 (chemisches Gemisch aus mit Polyalkylenoxid modifiziertem Heptamethyltrisiloxan [84 %] und Allyloxypolyethylenglykoldimethylether [16 %]) zugegeben. Die Agrobakterien-Suspension wurde unter ständigem Rühren (Magnetrührer) für die Pflanzentransformation verwendet. Nach dem „Floral Dip“ wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen horizontal in mit feuchtem Küchenpapier ausgelegte lichtundurchlässige Kisten gelegt und nach etwa 24 Stunden mit Leitungswasser besprüht. Anschließend wurden die Pflanzen in einer Folieneinfassung zur Reife gebracht und die Samen durch das Personal des Botanischen Gartens geerntet. Das Saatgut wurde für die Anzucht unter axenischen Bedingungen wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben weiter verwendet.

2.13.2 Tabak-Transformation

Zur stabilen genetischen Transformation von *Nicotiana tabacum* wurden ca. 2 Wochen alte auf MS-Medium unter axenischen Bedingungen angezogene Sämlinge

für 10 Minuten bei einem Druck von etwa 7 mbar im Exsikator in einer vorbereiteten Agrobakterien-Suspension inokuliert. Hierzu wurden 50 ml einer Agrobakterienkultur durch Zentrifugation (8 Minuten, 8000 g, RT) pelletiert und anschließend zweimal mit 25 ml 10mM MgSO₄-Lösung gewaschen (Zentrifugationsschritte: 8 Minuten, 8000 g, 4 °C). Das Agrobakterien-Pellet wurde anschließend in 10 mL der MgSO₄-Lösung resuspendiert und mit dieser Lösung eine OD_{560nm} eingestellt. Nach der Inokulation wurden die Tabak-Sämlinge auf sterilem Filterpapier zum Trocknen abgelegt und anschließend auf Petrischalen mit MSH-Medium ausgebracht und für 3 Tage im Pflanzenanzuchtsschrank inkubiert. Danach wurden die Pflanzen auf Platten mit MSH-VC-Medium und dem erforderlichen Selektions-Antibiotikum bzw. Herbizid ausgebracht (V: Vancomycin, C: Cefotaxim – beide Antibiotika zusammen verhindern ein Überwachsen der Tabakpflanzen mit Agrobakterien – alternativ kann auch Ticarcillin [TIC] verwendet werden).

2.14 Molekularbiologische Arbeiten

2.14.1 PCR und Klonierungen

Klonierungsschritte und PCRs wurden, sofern nicht ausdrücklich erwähnt, entsprechend den gängigen Methoden durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001).

2.14.2 Klonierung des Vektors pNHEJ

Das Gentamycin-Resistenz verleihende Gen *aacC1* wurde mittels PCR (Primerkombinationen *aacC1-n-FW* + *aacC1-n-RV* bzw. *aacC1-n-FW* + *aacC1-i-RV*) aus dem Vektor pPZP121 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) amplifiziert. Über Adapter in diesen Primern wurden Schnittstellen für *KpnI* sowie *I-SceI* (n: *I-SceI*-Schnittstellen in gleicher Orientierung zueinander, i: *I-SceI*-Schnittstellen in inverser Orientierung zueinander) beiderseits eingefügt. Die PCR-Produkte (n bzw. i) wurden als *KpnI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle des Plasmids pGUS23 (Puchta & Hohn, 1991a) zwischen CaMV35S Promotor und *uidA*-Reportergen (GUS) kloniert. Aus den resultierenden Vektoren pMP1-n bzw. pMP1-i wurde der gesamte Bereich als *EcoRI*-Fragment in den Vektor pPZP111 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) kloniert, welcher als Selektionsmarker für transgene Pflanzen ein Kanamycin-Resistenzgen kodiert, welches zusätzlich zu der von *I-SceI*-Schnittstellen flankierten Gentamycin-Resistenz verwendet werden kann. Die entstandenen Konstrukte werden im Folgenden als pNHEJ-n bzw. pNHEJ-i bezeichnet.

2.14.3 Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM[®]-T Vektor

Zur Vorbereitung der Sequenzierung verschiedener rekombinanter DNA-Verknüpfungen beim Test des NHEJ-Systems (siehe Kapitel 3.2.4, Abbildung 3.14) wurden PCR-Produkte in den Vektor pGEM[®]-T (Promega GmbH, Mannheim) nach Vorschrift des Herstellers kloniert.

2.14.4 Sequenzierungen

Alle im Rahmen dieser Arbeit erforderlichen DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (GATC Biotech AG, Konstanz) durchgeführt.

2.14.5 DNA-Schnellpräparation aus Pflanzen

Eine geringe Menge Blattmaterial wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zu feinem Pulver zermahlen. Daraufhin wurden 500 µl Shorty-Extraktionspuffer sowie 1,8 U RNase zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurden die groben Zelltrümmer durch Zentrifugation (12.100 g, 5 Minuten) abzentrifugiert. Von dem wässrigen Überstand wurden 350 µl in ein Reaktionsgefäß überführt, in welches bereits 350 µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Die Lösungen wurden durch vorsichtiges Invertieren gemischt und die ausgefallene DNA anschließend für 10 Minuten bei 12.100 g pelletiert. Nach dem Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur wurden 200 µl TE-Puffer zugegeben und die DNA gelöst (Eppendorf Thermomixer compact, 37 °C, 750 rpm). DNA aus solchen Schnellpräparationen wurden für PCR-basierte Screenings verwendet.

2.14.6 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

Etwa 2 g Blattmaterial wurde in einem vorgekühlten Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermahlen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 5 ml frisch zubereiteter Isolierungspuffer zugegeben und gründlich mit dem Pulver gemischt. Diese Suspension wurde für eine Stunde bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Chloroform wurde bei 8000 g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Epiphase wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 18 U RNase bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Durch Mischen mit 5 ml eiskaltem Isopropanol wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (8000 g, 10 Minuten, 4 °C) die genomische DNA

pelletiert. Das Pellet wurde mit 2 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen (8000 g, 5 Minuten, 4 °C) und bei Raumtemperatur getrocknet, Anschließend wurden 200 µl TE-Puffer zugegeben und die DNA über Nacht bei 4 °C gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei –20 °C.

2.14.7 Histochemische Färbung

Zum Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität im pflanzlichen Gewebe wurden *Arabidopsis*-Pflanzen auf GM-Medium angezogen und im Alter von 17 Tagen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von etwa 25 ml frisch hergestellter Färbelösung (Kapitel 2.2.2) wurden die Zentrifugenröhrchen für zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung durch dieselbe Menge 70 %-iges Ethanol ersetzt und die Ansätze bei 65 °C für mindestens eine Stunde im Wasserbad inkubiert, um die Chlorophylle aus den Blättern herauszulösen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur in 70 %-igem Ethanol. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines Binokulars.

2.14.7.1 Berechnung des Induktionsfaktors

Unter dem Binokular wurde die Anzahl apparenter Rekombinations-Ereignisse (blaue Spots) von Experimental-Kreuzungen (Kreuzung von NHEJ-Linien mit der I-SceI-Expressionslinie) sowie Kontrollkreuzungen (Kreuzung von NHEJ-Linien mit Wildtyp-Pflanzen) bestimmt. Der Induktionsfaktor ergibt sich aus der Summe aller apparenten Rekombinations-Ereignisse (aRE) der Nachkommen der Experimentalkreuzung (Genotyp: NHEJ^{+/-} I-SceI^{+/-}) dividiert durch die Summe aller apparenten Rekombinations-Ereignisse (aRE) der Nachkommen der Kontrollkreuzung (Genotyp: NHEJ^{+/-}) nach folgender Formel:

$$\text{IF: Induktionsfaktor } (\sum \text{aRE}_{\text{I-SceI}} / \sum \text{aRE}_{\text{WT}})$$

2.14.8 Southern Blot-Analysen

2.14.8.1 Restriktionsspaltung

Genomische DNA von Tabak- bzw. *Arabidopsis*-Pflanzen wurde wie in Kapitel 2.14.6 beschrieben isoliert. Die extrahierte DNA wurde mit auf die Fragestellung abgestimmten Restriktionsenzymen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Hierbei kamen zum Einsatz: *Bsa*XI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III und I-SceI. Es wurden 100 µl

genomische DNA (unterschiedliche Konzentrationen) mit 20 U Restriktionsenzym und dem erforderlichen Puffer nach Vorschrift des Herstellers gemischt. Zudem wurde Spermidin zugegeben (Endkonzentration 5 mM) und das Reaktionsvolumen auf 200 µl eingestellt. Im Falle von I-SceI-Restriktionsspaltungen wurde EcoRI-behandelte genomische DNA zunächst wie unten beschrieben gereinigt und dann mit I-SceI über Nacht inkubiert.

Die Reinigung und Aufkonzentration der DNA-Restriktionsspaltungsansätze erfolgte mittels Präzipitation durch Zugabe von 2,5 Volumenanteilen 99,8 %-igem Ethanol und 1/30 Volumenanteil kalten Na-Acetats (3 M, pH 5,2). Das Gemisch wurde für 30 Minuten bei -80 °C gelagert und die ausgefallene DNA durch Zentrifugation (12.500 g, 30 Minuten, 0 °C) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet dreimal mit 0,5 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen (Zentrifugationsschritte: 12.500 g, 10 Minuten, 0 °C). Die gewaschene DNA wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Die Berechnung der Ausgangskonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{DNA-Gehalt in ng/}\mu\text{l} = \text{OD}_{260} * 50 / \text{Verdünnungsfaktor}$$

Nach Möglichkeit wurden 10 µg geschnittene und gereinigte DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Die Berechnung des Ansatz-Volumens, welches daher in die Geltaschen geladen werden muss, ergibt sich wie folgt:

$$\text{Volumen (in }\mu\text{l)} = 10.000 \text{ ng} / \text{DNA-Gehalt ng} / \mu\text{l}$$

2.14.8.2 Blotting

Etwa 10 µg geschnittene und gereinigte DNA wurden in die Geltasche eines 1 %-igen Agarosegels (EtBr-Konzentration 0,1 µg/l) geladen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte zunächst für ca. zwei Stunden bei 80 V und anschließend über Nacht bei 50 V. Anschließend wurde das Gel jeweils 30 Minuten unter leichtem Schütteln in Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer und in 20x SSC-Puffer inkubiert. Das Gel wurde daraufhin gemäß der Hersteller-Vorschrift zur Übertragung der DNA auf die Nylon-Transfermembran „Hybond N+“ in die S&S TurboBlotter-Apparatur gelegt. Nach dem 3-stündigen Blotting wurde die Nylonmembran für 5 Minuten in 2x SSC-Puffer gewaschen und anschließend zwischen zwei Glasscheiben gelegt. Zur irreversiblen Fixierung der DNA auf der

Membran wurde diese für zwei Stunden bei 80 °C gebacken. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran in einer Kunststoffhülle bei 4 °C aufbewahrt.

2.14.8.3 Herstellung und Markierung der DNA-Sonden

Im Rahmen dieser Arbeit kamen vier verschiedene Sonden zum Einsatz (Abbildung 2.1). Zwei der Sonden wurden als Restriktions-Fragmente aus Plasmiden erhalten, während die anderen beiden als PCR-Produkte erzeugt wurden. Alle Fragmente wurden aufgereinigt und anschließend die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe auch Kapitel 2.14.8.1). Zur radioaktiven Markierung der DNA-Fragmente mit α - ^{32}P -dCTP (GE Healthcare) wurde das MegaprimeTM DNA Labelling Kit (GE Healthcare) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die nominale spezifische Aktivität des in die Markierungs-Reaktion (Gesamtvolumen: 50 μl) eingesetzten α - ^{32}P -dCTPs betrug 1,85 MBq (50 μCi). Die Halbwertszeit wurde nicht berücksichtigt, da die ^{32}P -dCTP-Lösung immer zeitnah zum Kalibrierungsdatum verwendet. Nach Abschluss der Reaktion wurde der Markierungsansatz mit 900 μl TE-Puffer gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde die radioaktivmarkierte Sonde in die Hybridisierung-Reaktion eingesetzt.

2.14.8.4 Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde mit der DNA-tragenden Seite (s.o.) nach innen eingerollt und vorsichtig in eine Hybridisierungsröhre geschoben. Nach Zugabe von 50 ml Hybridisierungspuffer wurde dieser durch leichtes Drehen der Röhre auf der Membran verteilt. Luftblasen wurden mit Hilfe einer stumpfen Pinzette entfernt. Anschließend wurde die Membran zwecks Prähybridisierung für zwei Stunden bei 60 °C im Hybridisierungsofen rotierend inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde (950 μl) in die Hybridisierungsröhre pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte für 18 Stunden bei 60 °C (unabhängig von der Länge der verwendeten Sonde). Danach wurde die Hybridisierung-Lösung entfernt und die Membran wurde zweimal für 5 Minuten mit auf 60 °C vorgewärmtem Waschpuffer I behandelt, um freies α - ^{32}P -dCTP bzw. ungebundene Sondenmoleküle zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die Membran ebenfalls bei 60 °C zweimal für 15 Minuten mit Waschpuffer II gewaschen. Danach wurden die Membranen in Folie eingeschweißt, um eine Kontamination der Imaging Plates sowie BAS-Cassetten zu vermeiden.

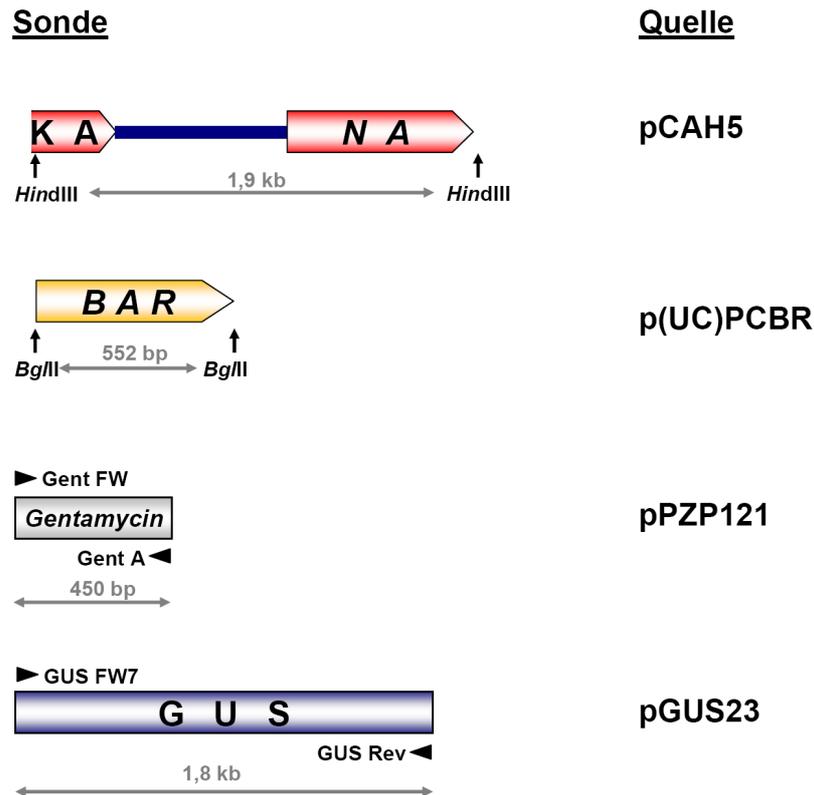


Abbildung 2.1: Sonden für die Southern Blot Detektion. Als Kanamycin-Resistenzgen-spezifische Sonde wurde ein 1,9 kb großes *HindIII*-Restriktionsfragment aus dem Plasmid pCAH5 (Hrouda und Paszkowski, 1994) verwendet, bei welchem die beiden Exons (KA, NA) des Kanamycin-Resistenzgens *nptII* durch eine Intronsequenz verbunden werden. Eine 552 bp große Sonde gegen das PPT-Resistenzgen *BAR* wurde durch Restriktionsspaltung des Vektors p(UC)PCBR mit *BglII* und anschließender Extraktion des Fragmentes aus einem Agarose-Gel erhalten. Eine 450 bp große Gentamycin-Resistenzgen-spezifische Sonde wurde mittels PCR (Primerkombination Gent FW + Gent A) aus dem Plasmid pPZP121 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) amplifiziert. Ebenfalls als PCR-Produkt (Primerkombination GUS FW7 + GUS Rev) wurde eine 1,8 kb große GUS-spezifische Sonde aus dem Vektor pGUS23 (Puchta & Hohn, 1991a; Schultze *et al.*, 1990) amplifiziert.

2.14.8.5 Detektion

In BAS-Cassetten wurden über Nacht strahlungssensitive Imaging Plates auf den gewaschenen Membranen exponiert. Die Auswertung erfolgte im Bio-Imaging-Analyser BAS-1500.

2.14.9 Bestimmung von T-DNA-Insertions-Loci der NHEJ-Linien

Zur Bestimmung der T-DNA-Insertionsstellen der NHEJ-Linien wurde das SiteFinding-Protokoll (Abbildungen 2.2 und 2.3, Tan *et al.*, 2005) angewandt. Die für dieses Protokoll erforderlichen Primer sind in Abbildung 2.2 dargestellt. Mit Hilfe dieser Methode wurden die an die LB angrenzenden Genombereiche sequenziert. Mit dieser Information und der in den Datenbanken zugänglichen Sequenz des

Arabidopsis-Genoms lassen sich Primer konzipieren, mit denen ein PCR-basiertes Screening auf hemi- bzw. homozygote NHEJ-Linien möglich ist. Außerdem können dadurch auch die an die RB angrenzenden Genombereiche problemlos amplifiziert und sequenziert werden.

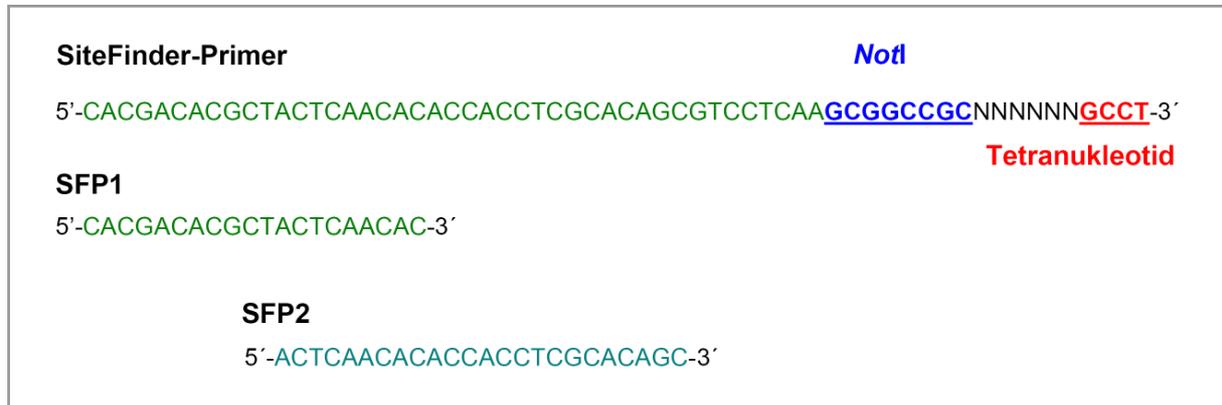


Abbildung 2.2: SiteFinder-Primer. Der SiteFinder-Primer ist 61 Nukleotide lang und bindet an Stellen im Genom, welche die Tetranukleotid-Sequenz GCCT (rot) aufweisen. Die Bindungseigenschaften dieses Oligonukleotids werden durch die sechs zufälligen Nukleotide (N) verbessert. Die *NotI*-Schnittstelle ist für die im weiteren Verlauf der Reaktion erforderliche Klonierung in den Vektor pBluescript SK+ erforderlich. Die 5' davon lokalisierten 43 Nukleotide dienen als Bindungsstelle für die Primer SFP1 und SFP2 (siehe auch Abbildung 2.3).

Je 2 µl der genomischen DNA (1:100 verdünnt) der NHEJ-Linien wurden für die SiteFinding-Reaktion nach folgendem Ansatz eingesetzt:

2	µl	gDNA (1:100)
1	µl	SiteFinder-Primer (100µM)
1	µl	dNTPs (10mM)
2	µl	10x Ex-Taq TM -Puffer (TaKaRa)
0,1	µl	Ex-Taq TM -Polymerase (TaKaRa)
13,9	µl	ddH ₂ O
<hr/>		
20	µl	

Folgendes PCR-Protokoll wurde für die SiteFinding-Reaktion angewandt :

Zyklus 1:	(1x)	
Schritt 1:	92,0°C	für 02:00 Minuten
Schritt 2:	95,0°C	für 01:00 Minute
Schritt 3:	25,0°C	für 01:00 Minute
	Anstieg auf 68,0°C	0,1°C / s
Schritt 4:	68,0°C	10:00 Minuten
Schritt 5:	4,0°C	Reaktionsstopp

Hierbei wird in Schritt 3 „Anstieg auf“ die Temperatur der Probe über einen Zeitraum von 10 Minuten in 0,1 °C / Sekunde-Intervallen angehoben, um unspezifische Bindungen des SiteFinder-Primers zu unterbinden. Anschließend wurde der SiteFinder-Reaktionsansatz mit 0,5 µl Ex-Taq-Puffer (10x), 2,25 µl SFP1 (50 pmol, 5'-CACGACACGCTACTCAACAC-3') und 2,25 µl des T-DNA-spezifischen Primers K4 (10 pmol, 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3') versetzt und eine „primäre“ PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Zyklus 1:	(1x)		
	Schritt 1:	95,0°C	für 01:00 Minute
Zyklus 2:	(30x)		
	Schritt 1:	95,0°C	für 00:10 Minuten
	Schritt 2:	58,0°C	für 00:30 Minuten
	Schritt 3:	72,0°C	für 03:00 Minuten
Zyklus 3:	(1x)		
	Schritt 1:	72,0°C	für 05:00 Minuten
Zyklus 4:	(1x)		
	Schritt 1:	4,0°C	Reaktionsstopp

Im Anschluss an die primäre PCR wurde eine „sekundäre nested“ PCR durchgeführt, in welcher der SFP2-Primer (50pmol, 5'-ACTCAACACACCACCTCG CACAGC-3'), sowie die beiden T-DNA-spezifischen Primer K7 (50 pmol, 5'-CGAATA TCATGGTGGAAAATGG-3') und UFW-TGIUS-LB1 (50 pmol, 5'-GGACCGCTATCAG GACATAG-3') eingesetzt wurden. Das PCR-Protokoll entspricht dem der „primären“ PCR.

Die Aufreinigung der PCR-Proben der „sekundären nested“ PCR (SFP2 und UFW-TGIUS-LB1) erfolgte mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kits (Roche). Für die anschließende Klonierung wurden die aufgereinigten PCR-Proben mit *NotI* geschnitten und in die MCS des mit *NotI* und *EcoRV* geschnittenen Vektors pBluescript SK+ kloniert. Diese Klone wurden dann mit M13 Primern (M13 FW, M13 Rev) sequenziert.

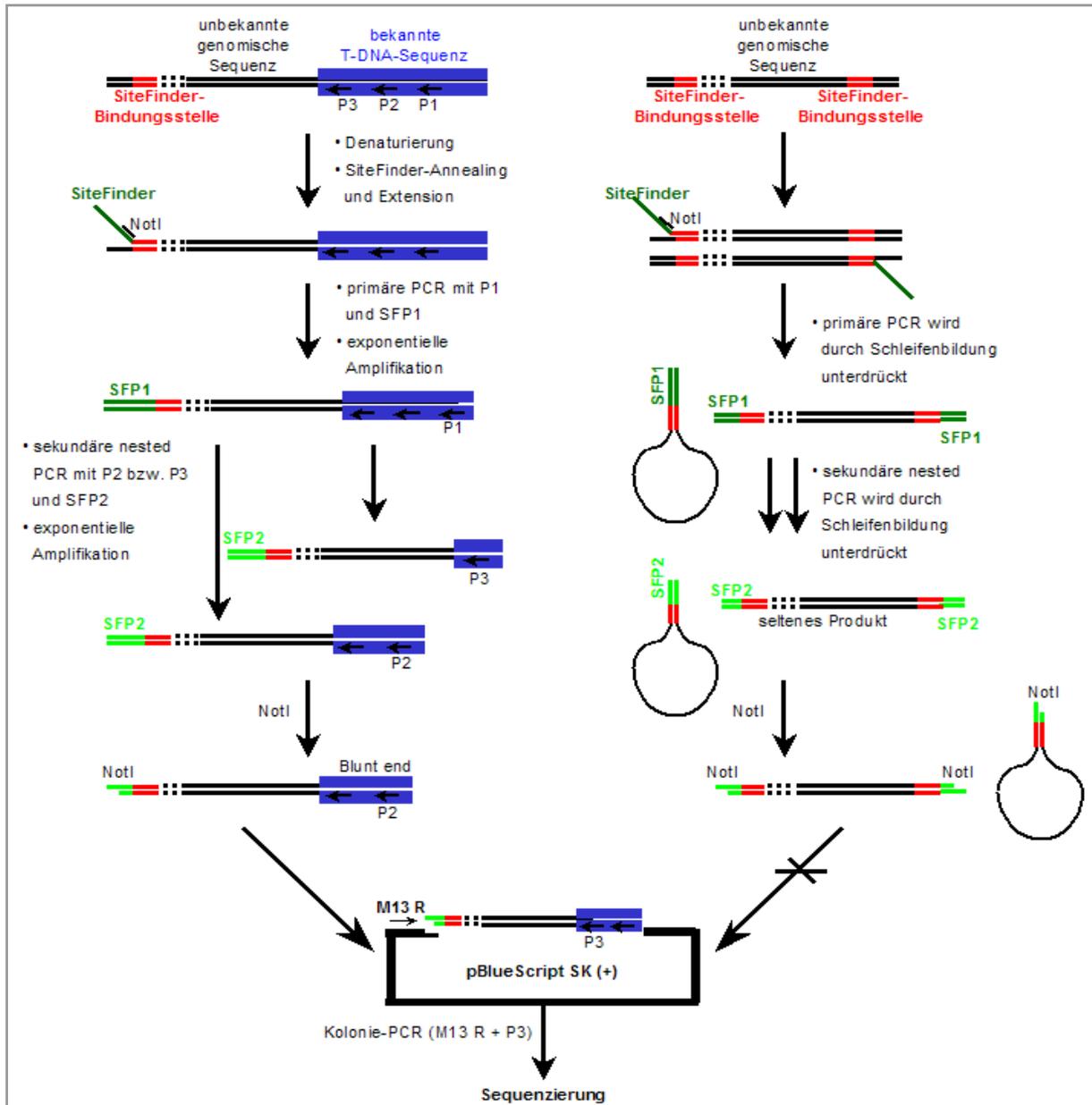


Abbildung 2.3: Prinzip der SiteFinder-Reaktion. Ausgangspunkt zur Bestimmung der T-DNA-Insertionsstelle ist eine bekannte T-DNA-Sequenz, welche von einer unbekanntem genomischen Sequenz flankiert wird (linke Seite). Zur Analyse der unbekanntem Sequenz werden drei aufeinander folgende T-DNA-spezifische Primer (P1-P3) sowie drei SiteFinder-Primer (SiteFinder, SFP1, SFP2) benötigt. In der SiteFinder-Reaktion wird die genomische DNA denaturiert und der SiteFinder-Primer kann über ein häufig im Genom vorkommendes Tetranukleotid an die DNA binden (SiteFinder-Bindungsstellen). Dann folgt eine „primäre“ PCR mit dem SFP1-Primer, der am Ende des SiteFinder-Primers bindet und mit dem am weitesten innerhalb der T-DNA-gelegenen Primer (P1), wodurch der Bereich zwischen SiteFinder-Bindungsstelle und P1 amplifiziert wird. Zur Erhöhung der Spezifität wird das PCR-Produkt in einer „sekundären nested“ PCR eingesetzt, wobei SFP2, der versetzt zu SFP1 weiter innerhalb des Amplicons bindet mit P2 bzw. P3 verwendet. Durch diese zweite PCR entstehen mit beiden Primerkombinationen verschieden große Fragmente, die nebeneinander auf ein Agarosegel aufgetragen auf Grund eines „shifts“ zu erkennen sind. Die amplifizierten Fragmente können anschließend mit *NotI* gespalten werden, da die Restriktionsschnittstelle über den SiteFinder-Primer zu Beginn eingefügt wurde. Das geschnittene PCR-Fragment kann dann über die *NotI*-Schnittstelle und über die entstandenen blunt-ends in den Vektor pBluescript SK+ kloniert und sequenziert werden. Die Amplifikation unspezifischer Produkte wird zum einen durch die Bildung zirkulärer Strukturen und zum anderen durch die einseitige blunt-end-Ligation unterbunden (rechte Seite). Abbildung aus Tan *et al.* (2005), verändert.

2.14.10 Bestimmung der RB-Flanke der NHEJ-Linien

Anhand der Kenntnis der Integrations-Loci der NHEJ-T-DNAs (siehe Kapitel 2.14.9) können Genom-spezifische Primer konzipiert werden, welche 5´ bzw. 3´ der T-DNA liegen. Die Sequenz der die RB flankierenden genomischen DNA kann dann unter Verwendung eines der beiden Genom-spezifischen Primer und einem T-DNA-spezifischen Primer nahe der RB amplifiziert und sequenziert werden. Die zur Bestimmung der RB-Flanken der NHEJ-Linien verwendeten Primer und PCR-Protokolle sind Tabelle 2.3 zu entnehmen. Mit den Genom-spezifischen sowie einem der T-DNA-spezifischen Primer können wie in Abbildung 2.4 gezeigt hemi- und homozygote NHEJ-Linien mittels PCR voneinander unterschieden werden.

Tabelle 2.3: Primerkombinationen und PCR-Protokolle zur Bestimmung der die RB flankierenden Genomsequenzen in den NHEJ-Linien. Die Genom-spezifischen Primer sind blau hervorgehoben.

Assay-Linie	Primerkombination	PCR-Bedingungen
NHEJ n-15	35S RV1 / NHEJ n-15 RB	95°C, 30"; 60°C, 30"; 72°C, 3'
NHEJ i-1	MP 69 FW /Gent S	95°C, 30"; 58°C, 30"; 72°C, 1'30"
NHEJ i-2	MP70 RV / Gent S	95°C, 30"; 58°C, 30"; 72°C, 1'30"
NHEJ i-7	35S RV1 / NHEJ i-7 RB	95°C, 30"; 56°C, 30"; 72°C, 3'

2.14.11 Charakterisierung der T-DNA-Insertions-Loci der NHEJ-Linien

Die Kenntnis beider an die T-DNA angrenzenden genomischen Sequenzen erlaubt eine Aussage über Sequenz-Veränderungen am Integrations-Locus, welche auf die Insertion der T-DNA zurück zu führen sind. Die flankierenden Sequenzen wurden daher mittels PCR mit einer Kombination aus einem Genom-spezifischen und einem T-DNA-spezifischen Primer amplifiziert (siehe Abbildung 2.4) und die Sequenz analysiert. Hierfür wurden einfache DNA-Isolierungen verwendet (Kapitel 2.14.5).

2.14.12 PCR-basierte Genotypisierung von NHEJ-Linien

Zum Nachweis des Genotyps der NHEJ-Linien wurden zum Einen eine genspezifische Primerkombination und zum Anderen eine Kombination aus Genom- und T-DNA-spezifischen Primern in einer PCR-Reaktion eingesetzt (Abbildung 2.4), wobei die DNA-Menge einer einfachen DNA-Isolierung (Kapitel 2.14.5) ausreichend ist. Die Auswertung erfolgt wie in Tabelle 2.4 aufgeführt.

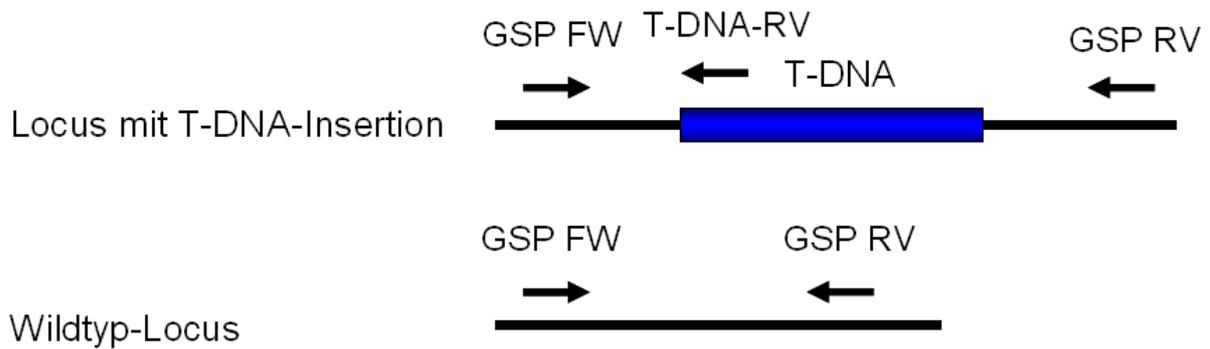


Abbildung 2.4: Prinzip des PCR-Screenings von NHEJ-Linien. Durch Verwendung eines Locus-spezifischen FW-Primers (GSP FW) und eines T-DNA-spezifischen RV-Primers entsteht ausschließlich bei der T-DNA-Insertions-Linie ein PCR-Fragment. Mit dieser Primerkombination allein kann zwischen homozygot und hemizygot nicht unterschieden werden. Unter Verwendung von zwei Loci-spezifischen Primern (GSP FW, GSP RV), welche die T-DNA überspannen, entsteht beim Wildtyp und bei für die T-DNA hemizygoten Pflanzen ein Fragment. Durch die Wahl der Elongationszeit bei der PCR entsteht bei der homozygoten T-DNA-Insertions-Linie auf Grund der Größe der T-DNA-Insertion kein Produkt.

Tabelle 2.4: Genotypisierung von T-DNA-Insertions-Linien. Durch den Vergleich der Bandenmuster der beiden Primerkombinationen kann zwischen homozygoten, hemizygoten und Wildtyp-Pflanzen unterschieden werden.

Genotyp	GSP FW + T-DNA-RV	GSP FW + GSP RV
Wildtyp	–	+
hemizygot	+	+
homozygot	+	–

3 Ergebnisse

3.1 Induktion reziproker Translokationen im Tabak-Genom

3.1.1 Konzept des experimentellen Systems

Zur Charakterisierung von durch Doppelstrangbrüche induzierten Veränderungen im Pflanzengenom wurde im Rahmen dieser Arbeit ein experimentelles System entwickelt, welches in einem einzigen Ansatz die Bearbeitung verschiedener Fragestellungen ermöglicht. Das System basiert auf zwei voneinander unabhängigen transgenen Sequenzen (T-DNAs), welche beide neben einem spezifischen Selektionsmarkergen eine Erkennungssequenz für die Meganuklease I-SceI enthalten.

Wird in einem Genom, welches beide T-DNAs enthält, I-SceI exprimiert, so sollten gleichzeitig zwei Doppelstrangbrüche auftreten. Diese können entweder dadurch repariert werden, dass die ursprünglich miteinander verbundenen Enden wieder miteinander verknüpft werden oder aber es kann zu einer Translokation kommen, durch welche andere Enden miteinander verbunden werden (Abbildung 3.1). Zum Nachweis einer solchen Neuverknüpfung ehemals ungekoppelter Enden wurde ein Selektionsmarker eingesetzt: beide T-DNAs tragen nicht-funktionelle Teile eines Kanamycin-Resistenzgens (*nptII*). Dieser Marker wird durch eine artifizielle Intronsequenz in zwei Exons geteilt (Hroudá und Paszkowski, 1994; Puchta *et al.*,

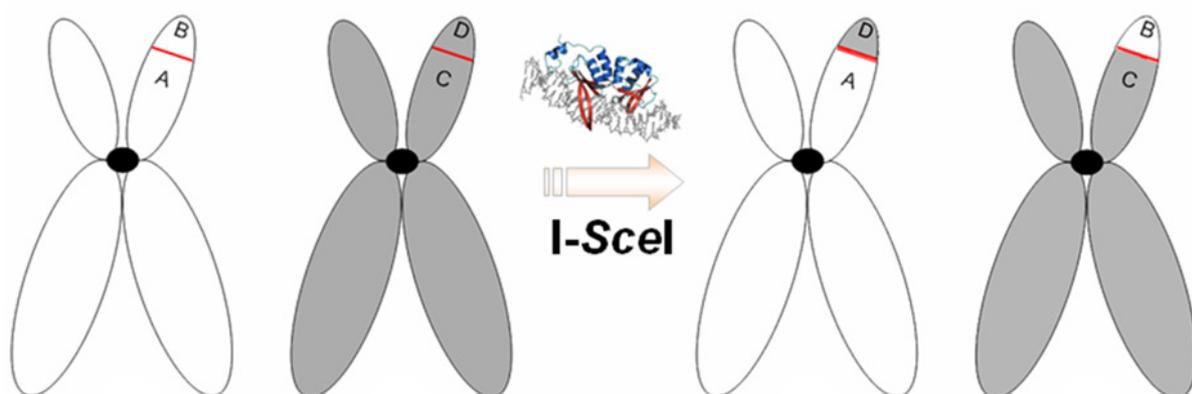


Abbildung 3.1: I-SceI-vermittelte Induktion einer reziproken Translokation im Genom von *Nicotiana tabacum*. Auf verschiedenen Chromosomen (weiß, grau) im Tabak-Genom sind zwei verschiedene Transgensequenzen (T-DNAs A—B und C—D) integriert. Beide T-DNAs enthalten eine Schnittstelle für die Meganuklease I-SceI (roter Balken). Kommt es durch Expression von I-SceI zu zwei simultanen Doppelstrangbrüchen in einem Genom und bei deren Reparatur zu einer reziproken Translokation, sollten zwei neue Kopplungen (A—D und C—B) auftreten. Zur Vereinfachung der Darstellung sind die Transgensequenzen jeweils nur auf einem der beiden Schwesterchromatiden eingezeichnet. Die Darstellung des an dsDNA gebundenen I-SceI-Proteins als Bestandteil dieser Abbildung wurde freundlicherweise von CELLECTIS SA (Romainville Cedex, Frankreich) genehmigt.

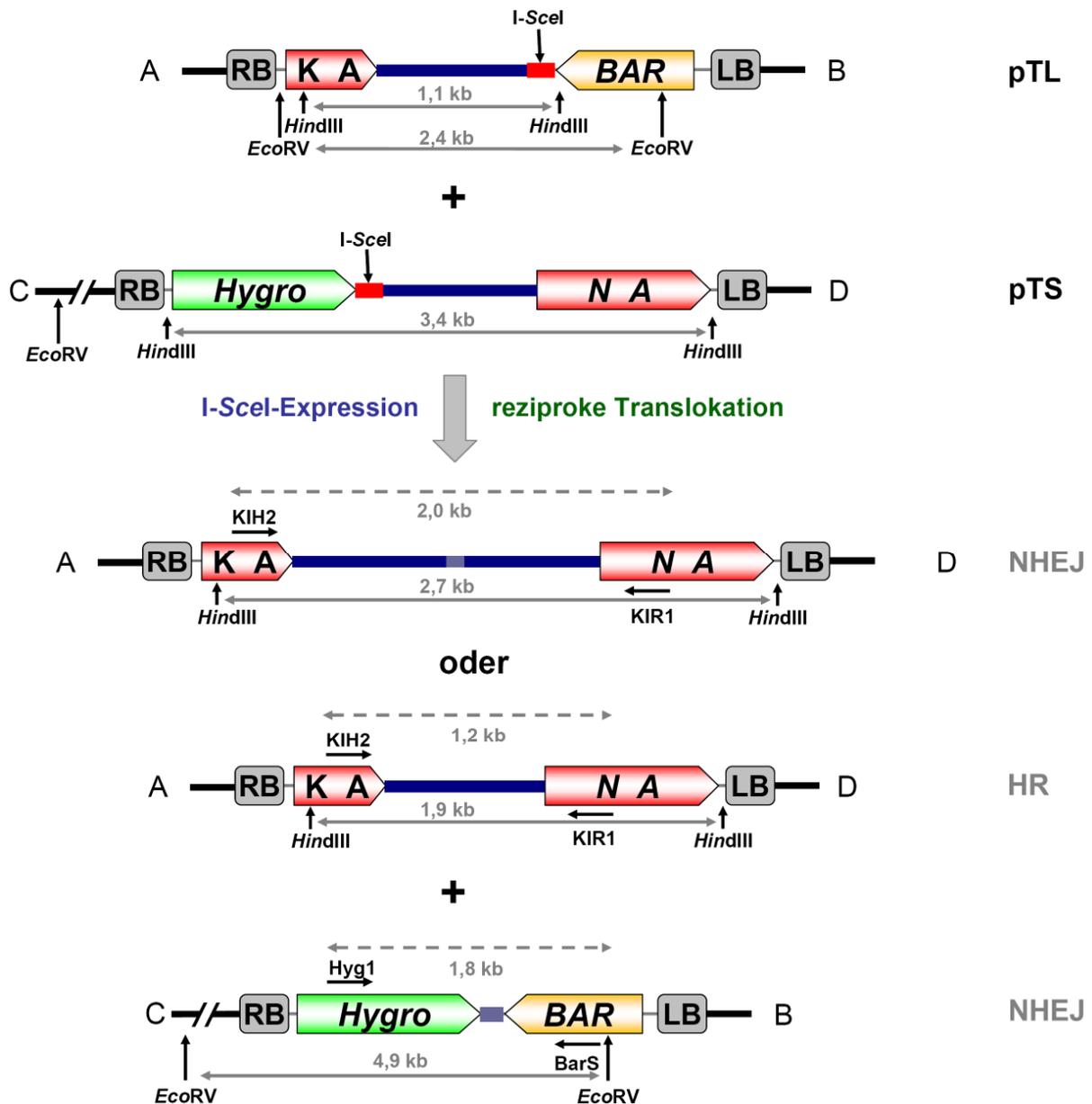


Abbildung 3.2: Experimentelles System zur Untersuchung I-SceI-induzierter reziproker Translokationen im Tabak-Genom. Gezeigt sind schematische Darstellungen der T-DNAs pTL und pTV sowie mögliche Produkte reziproker Translokations-Ereignisse. Die T-DNA pTL (Transgen A—B) enthält ein 266 Nukleotide großes 5'-Exon des Kanamycin-Resistenz verleihenden *nptII*-Gens unter der Kontrolle eines CaMV35S-19S-Hybrid-Promotors (Paszkowski *et al.*, 1992). In der 3'-Region dieses Exons schließt sich eine 905 bp umfassende Intronsequenz an, die ursprünglich aus dem Genom von *Phaseolus vulgaris* stammt (Intron 3 des Phaseolin-Gens, zur Klonierung siehe Paszkowski *et al.* [1992]). Downstream dieses Introns ist eine 18 Nukleotide umfassende Erkennungssequenz der Meganuklease I-SceI lokalisiert. Dahinter befindet sich in inverser Orientierung ein PPT-Resistenzgen (*BAR*). Die T-DNA pTV (Transgen C—D) kodiert RB-seitig ein Hygromycin-Resistenzgen als Selektionsmarker, 3' davon befindet sich eine I-SceI-Erkennungssequenz sowie ein 1004 bp großes Intron mit 100 %-iger Sequenzhomologie über 847 bp zu jenem in pTL. Hinter dem Intron ist das 3'-Exon (615 nt) des Kanamycin-Resistenz verleihenden *nptII*-Gens lokalisiert. Kommt es durch Expression der Meganuklease I-SceI in einem Genom, welches beide Transgene enthält, zu zwei simultanen Doppelstrangbrüchen, so kann deren Reparatur unter anderem zu der dargestellten reziproken Translokation führen. Eine Kopplung der Transgenhälften A und D kann sowohl durch NHEJ als auch auf Grund der Sequenzhomologie im Intron durch homologe Rekombination zu Stande kommen. Diese Ereignisse können mittels PCR (Primerkombination KIH2 / KIR1) unterschieden werden. In beiden Fällen entsteht ein funktionelles Kanamycin-Resistenzgen, da die zwischen den Exons liegende Intronsequenz die für den Spleißapparat erforderlichen Donor- und

Abbildung 3.2: Fortsetzung. Akzeptor-Stellen enthält. Mit dem beschriebenen System ist eine Selektion auf die Kopplung der Transgen-Hälften C und B nicht möglich, deren Existenz kann jedoch mittels PCR (Primerkombination Hyg1 / BarS) nachgewiesen werden. Die unterbrochenen grauen Pfeile zeigen die Größe von PCR-Produkten an, während die durchgezogenen grauen Pfeile die Größe von Restriktions-Fragmenten bei der Detektion im Southern Blot wiedergeben. LB: Left Border, RB: Right Border, KA: 5'-Exon des *nptII*-Gens, *BAR*: PPT-Resistenzgen, *Hygro*: Hygromycin-Selektionsmarkergen, NA: 3'-Exon des *nptII*-Gens. Die Intronsequenz wird durch den dicken blauen Balken repräsentiert. Primerbindungsstellen sind durch waagerechte Pfeile angezeigt, Restriktionsschnittstellen sind durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet.

1996). Die T-DNA pTL enthält einen Promotor, das 5'-Exon des *nptII*-Gens sowie das Intron (im Folgenden auch als Transgenteile A und B bezeichnet). Die zweite T-DNA (pTS) enthält große Teile desselben Introns sowie das 3'-Exon des Kanamycin-Resistenzgens gefolgt von einem Terminator (im Folgenden auch als Transgenteile bzw. -hälften C und D bezeichnet, siehe auch Abbildung 3.2).

Kommt es nach einer I-SceI vermittelten Induktion zweier gleichzeitiger Doppelstrangbrüche zu einer Translokation, bei der die Transgenteile A und D miteinander verbunden werden, kann ein funktionelles Kanamycin-Resistenzgen restauriert werden. Diese Neuverknüpfung kann sowohl durch homologe Rekombination zwischen den beiden Intronsequenzen als auch durch nicht-homologe Rekombination erfolgen. Geschieht die Verknüpfung durch NHEJ, entsteht ein Kanamycin-Selektionsmarkergen, bei dem die beiden Exons durch ein größeres Intron unterbrochen werden. Dieses kann abhängig von der Prozessierung der beiden Bruchenden unterschiedlich groß sein. Da dieses von pTS und pTL abgeleitete Intron sowohl eine Donor- als auch eine Akzeptorstelle für das Spleißosom aufweist, kann nach der Reifung der dadurch kodierten prä-mRNA ein funktionelles NPTII-Protein gebildet werden. Auf Grund der Konzeption des experimentellen Systems kann daher die Häufigkeit der Verwendung von HR bzw. NHEJ zur Restaurierung des Selektionsmarkers direkt miteinander verglichen werden.

Während die Neuverknüpfung der beiden Transgenteile A und D durch das Auftreten eines selektierbaren Merkmals gekennzeichnet ist, können die anderen beiden Hälften (B und C) mit anderen zu diesem Zeitpunkt freien DNA-Enden verknüpft werden oder aber sie können durch eine reziproke Translokation miteinander verbunden werden. Da die beiden Transgenteile B und C keine Homologien zueinander aufweisen, kann eine Verknüpfung zwischen ihnen nur durch NHEJ erfolgen. Das Zustandekommen einer solchen Kopplung kann nicht, wie

für A—D beschrieben, durch einen Selektionsmarker detektiert werden. Da eine Kopplung von A und D und die damit einhergehende Kanamycinresistenz auf Grund der Konzeption des experimentellen Systems Voraussetzung für das Zustandekommen der Verbindung C—B sind, wurden nur Kanamycin-resistente Pflanzen hinsichtlich der C—B-Kopplung mittels PCR getestet.

Im Rahmen früherer Untersuchungen zur Doppelstrangbruch-Reparatur durch HR wurde innerhalb der Arbeitsgruppe die transgene Tabak-Linie 1-12 verwendet, welche das Transgen pTS als Einzelkopie im Genom trägt. In diesen Studien wurde die Linie sehr genau charakterisiert und es konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass die Induktion von Doppelstrangbrüchen *in vivo* durch die Expression von I-SceI in dieser Linie möglich ist. Hierbei wurde die Reparatur des in pTS induzierten Doppelstrangbruches durch zeitgleich zur Verfügung gestellte Sequenzhomologien innerhalb einer mit dem I-SceI-Expressionskonstrukt kotransformierten T-DNA (Puchta *et al.*, 1996; Puchta, 1998; Reiss *et al.*, 2000) bzw. auch durch homologe Sequenzen von transgenen Sequenzen in ektopischen Positionen (Puchta, 1999) gezeigt. Dies ermöglicht zudem, mittels des beschriebenen experimentellen Systems die Häufigkeit des Auftretens von Translokationsereignissen mit ektopischen Rekombinationsereignissen zu vergleichen.

3.1.2 Etablierung des experimentellen Systems

Zunächst wurden etwa 14 Tage alte Tabakkeimlinge der Linie 1-12 durch Inokulation mit Agrobakterien mit der T-DNA pTL transformiert. Nach drei Tagen auf Platten mit MSH-Medium wurden die Pflanzen zur Induktion einer Kalluskultur auf MSH-Tic-PPT-Medium überführt. Aus den Kalli wurden für pTL transgene Pflanzen (T₁-Generation) regeneriert. Durch Segregations-Analysen und durch Southern Blots der Nachkommen (F₂-Generation, Daten nicht gezeigt) wurden Linien etabliert, welche pTL an einem Locus tragen. Drei Linien wurden für die weiteren Experimente ausgewählt und als IRC1, IRC7 und IRC10 bezeichnet. Diese sind homozygot für pTS und spalteten für pTL auf (unter Verwendung von PPT als Selektions-Herbizid sind 1/3 der Pflanzen homozygot für pTL, 2/3 sind hemizygot).

3.1.3 Induktion der Doppelstrangbrüche durch I-SceI

Zur transienten Expression der Meganuklease I-SceI wurden ca. 1000 – 2000 Pflanzen der F₂-Generation aller drei Linien mit Agrobakterien inokuliert, welche auf

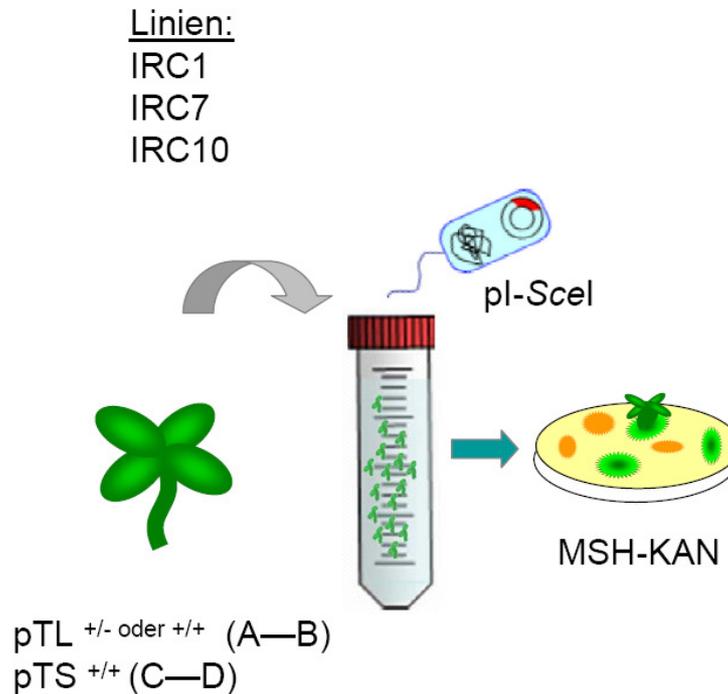


Abbildung 3.3: Induktion der Doppelstrangbrüche durch I-SceI. Etwa zwei Wochen alte transgene Pflänzchen der Linien IRC1, 7 und 10 wurden mit einer Agrobakterienkultur inokuliert, welche auf der T-DNA den I-SceI-ORF unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors trug. Der Pflanzentransformationsvektor kodierte keinen Marker zur Selektion transgener Pflanzen, da nur eine transiente Expression der Meganuklease beabsichtigt war. Nach der Inokulation wurden die Tabakkeimlinge zunächst für zwei Tage auf MSH-Platten inkubiert (nicht gezeigt), bevor sie auf MSH+TIC+KAN-Platten umgesetzt wurden. Ticarcillin unterbindet hierbei das Wachstum der an den Pflänzchen anhaftenden Agrobakterien. Die Tabak-Pflänzchen wurden über mehrere Monate wöchentlich auf frische MSH+TIC+KAN-Platten umgesetzt, wobei aus Kanamycin-resistenten Zellen Kalli entstanden. Aus diesen wuchsen kleine Sprosse aus, welche zur Regeneration rekombinanter Tabak-Pflanzen auf Hormon-freiem Selektionsmedium bewurzelt wurden (nicht gezeigt). Die Linien IRC1, 7 und 10 waren homozygot für das Transgen pTS und spalteten bezüglich pTL auf.

der T-DNA ihres binären Vektorsystems das offene Leseraster für I-SceI unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors enthielten (Abbildung 3.3). Nach drei Tagen auf Platten mit MSH-Medium wurden die Pflanzen zur Induktion einer Kalluskultur auf MSH-Tic-KAN-Medium überführt, welches Kanamycin zur Selektion von Zellen enthielt, bei denen nach I-SceI-induzierten Doppelstrangbrüchen in den Transgenen pTS und pTL die Teile A und D durch eine Translokation miteinander gekoppelt wurden. Als Kontrolle dienten jeweils etwa 400 – 500 junge Pflanzen derselben Linien, welche mit einem Agrobakterien-Stamm ohne T-DNA enthaltendes Plasmid inokuliert wurden (Tabelle 3.1).

3.1.4 Selektion auf chromosomale Translokationen

Wie Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, wurden auf dem Kanamycin-haltigen Kallus-Kulturmedium lediglich für die mit I-SceI induzierte Linie IRC1 84 Kalli erhalten. Bei allen Kontrollen sowie den beiden Ansätzen mit I-SceI transformierenden Agrobakterien starben die jungen Pflänzchen im Verlaufe der Zellkultur. Aus den Kanamycin-resistenten Kalli wurde zum Einen genomische DNA für PCR-Analysen isoliert, zum Anderen wurden aus den Kalli Pflanzen regeneriert und vermehrt.

3.1.5 PCR-Analyse der rekombinanten Kopplungen

Von allen 84 Kanamycin-resistenten Kalli wurde die DNA in PCR-Reaktionen mit der Primerkombination KIH2 und KIR1 eingesetzt (Abbildung 3.4), um die Kopplung der beiden Transgenteile A und D auf molekularer Ebene nachweisen zu können. Wie oben beschrieben, kann die Rekombination zwischen A und D sowohl durch HR als auch durch NHEJ erfolgen. Für HR-vermittelte Kopplungen wurde eine 1,2 kb große Bande und für NHEJ-vermittelte Ereignisse ein etwa 2 kb großes PCR-Produkt erwartet. In 33 Fällen wurde die 1,2 kb Bande nachgewiesen und in 51 Fällen konnte die für NHEJ-Ereignisse typische 2 kb Bande erhalten werden (Tabelle 3.1). Damit wurde gezeigt, dass in etwa 40 % aller Fälle die A—D-Verknüpfung durch homologe Rekombination zustande gekommen war. Sechs der 33 kleineren PCR-Produkte wurden sequenziert: für alle wurde dieselbe Sequenz erhalten und diese entsprach exakt der für HR-Ereignisse zwischen A und D vorhergesagten

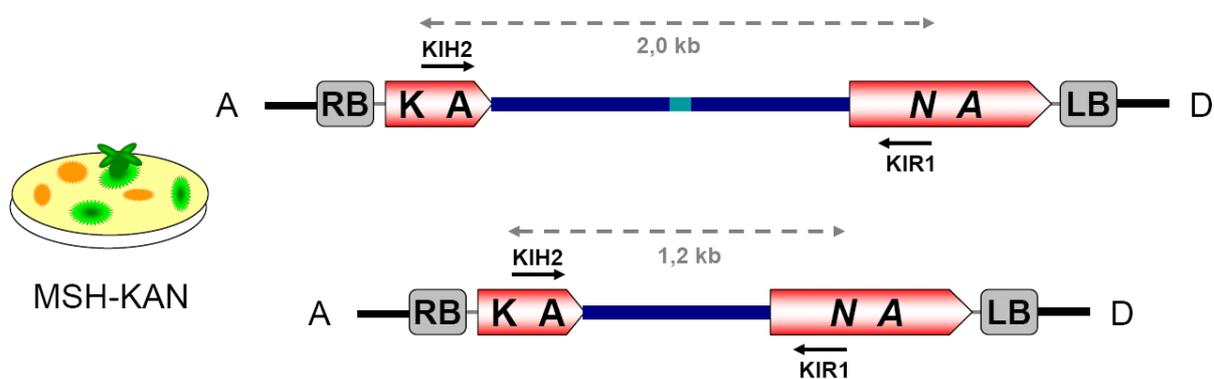


Abbildung 3.4: Nachweis der rekombinanten Kopplung A—D. Aus Kanamycin-resistenten Kalli wurde genomische DNA extrahiert und mittels PCR (Primerkombination: KIH2 / KIR1) hinsichtlich der Verknüpfung der Transgen-Hälften A und D überprüft. Ein Zustandekommen der rekombinanten Kopplung A—D durch NHEJ wird durch ein 2 kb großes PCR-Produkt angezeigt, während eine 1,2 kb große Bande für Ereignisse erhalten wird, bei denen A und D durch homologe Rekombination gekoppelt wurden.

Tabelle 3.1: Nachweis der rekombinanten Kopplung A—D. Tabak-Keimlinge der parentalen Linien IRC1, IRC7 und IRC10 wurden mit Agrobakterien inokuliert, welche eine transiente Expression der Meganuklease im Pflanzengewebe herbeiführen sollten (Pflanzentransformations-Vektor pI-Scel). Als Kontrollansatz wurden Keimlinge derselben parentalen Linien mit Agrobakterien inokuliert, welche keinen Pflanzentransformations-Vektor enthielten. Die jungen Pflänzchen (T₀-Generation) wurden zwei Tage nach der Inokulation auf MSH+TIC+KAN-Platten überführt. Insgesamt wurden 84 Kanamycin-resistente Kalli für die Linie IRC1 erhalten, während bei der entsprechenden Negativkontrolle keine Kalli gewonnen wurden. Für die Linien IRC7 und IRC10 wurden auch nach der transienten I-Scel-Expression keine Kalli erhalten. Aus Kanamycin-resistenten Kalli der Linie IRC1 wurde genomische DNA extrahiert und mittels PCR hinsichtlich der rekombinanten Kopplung A—D untersucht. Ein 2 kb großes PCR-Produkt ist repräsentativ für NHEJ-vermittelte Kopplungen zwischen den Transgen-Hälften A und D, während eine 1,2 kb große Bande für Ereignisse erhalten wird, bei denen A und D durch homologe Rekombination gekoppelt wurden.

Linie	I-Scel	T ₀ Pflanzen	PCR positiver Kalli für KA-NA	HR (1,2 kb)	NHEJ (2,0 kb)
IRC1	+	1140	84	33	51
	-	470	0		
IRC7	+	1980	0		
	-	550	0		
IRC10	+	1980	0		
	-	430	0		

Nukleotidabfolge.

Des Weiteren wurden sieben der 2 kb großen Banden sequenziert: in drei Fällen konnte gezeigt werden, dass eine intakte I-Scel-Schnittstelle beide Introns verband. In diesen Fällen wurde die Kopplung zwischen A und D also ohne eine Prozessierung der Enden durch einfache Ligation erreicht (Daten nicht gezeigt). In vier Fällen wurden kleine Deletionen von 2, 8, 12 und 28 Nukleotiden gefunden, die alle die I-Scel-Schnittstelle und teilweise benachbarte Sequenzen betrafen (Daten nicht gezeigt).

Wie oben beschrieben stellt in diesem experimentellen System die Rekombination der beiden Transgenteile A und D die Voraussetzung für das Zustandekommen der Verbindung C—B dar. Aus diesem Grund wurden aus den Kanamycin-resistenten Kalli Pflanzen regeneriert und diese mittels PCR hinsichtlich der C—B-Kopplung getestet (Abbildung 3.5). Insgesamt wurde aus 19 der regenerierten Pflanzen DNA isoliert und mittels PCR mit der Primerkombination Hyg1 und BarS getestet (Abbildung 3.5). In 16 Fällen wurden PCR-Produkte einer Größe von 1,8 kb erhalten und sequenziert. Die Auswertung der Sequenz-Analysen ist in Abbildung 3.6 zusammengefasst.

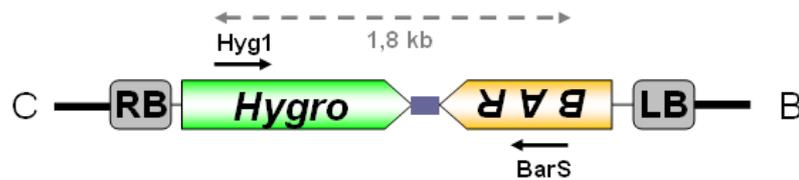


Abbildung 3.5: Nachweis der rekombinanten Kopplung C—B. Aus Kanamycin-resistenten Kalli wurden für die rekombinante Kopplung transgene Pflanzen regeneriert (F_1 -Generation) und durch Selbstung vermehrt. Die F_2 -Generation wurde auf MS-Kanamycin-Platten angezogen und aus resistenten Pflanzen genomische DNA extrahiert. Mittels PCR (Primerkombination: Hyg1 / BarS) wurden diese Linien hinsichtlich der Verknüpfung der Transgen-Hälften C und B überprüft. Ein Zustandekommen der rekombinanten Kopplung C—B durch NHEJ kann durch ein etwa 1,8 kb großes PCR-Produkt nachgewiesen werden.

Für die drei Linien IRC1 #7, IRC1 #9 und IRC1 #12 konnte gezeigt werden, dass die Kopplung der Transgenteile B und C durch einfache Ligation stattgefunden haben muss, da sie alle eine intakte I-SceI-Schnittstelle aufwiesen. Bei allen anderen untersuchten Linien muss die neue Kopplung durch NHEJ entstanden sein.

Wie oben beschrieben wurde nach der Inokulation der Linien IRC1, IRC7 und IRC10 mit dem die I-SceI-Expressionskassette übertragenden Agrobakterienstamm keine Selektion hinsichtlich einer stabilen Integration der die Meganuklease kodierenden Sequenz vorgenommen. Trotz der vorgesehenen transienten Transformation ist eine stabile Integration der Expressionskassette *per se* nicht auszuschließen. Daher wurden alle 16 Linien, für welche wie oben beschrieben die Kopplung der Transgenteile B und C nachgewiesen werden konnte, durch PCR mit der Primerkombination I-SceI FW und I-SceI RV getestet. Bei 11 der 16 überprüften Linien konnte tatsächlich die Existenz des I-SceI-ORFs gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die permanente Expression der Meganuklease könnte den Nachweis einfacher Ligationereignisse zwischen den Transgenteilen B und C verhindern, da eine hierbei entstehende intakte I-SceI-Schnittstelle kontinuierlich als Substrat des Enzyms dienen würde. In der Tat wurde für die beiden Linien IRC1 #9 und IRC1 #12, welche eine funktionelle I-SceI-Schnittstelle zwischen den gekoppelten Transgenhälften B und C aufweisen, keine stabile Integration der I-SceI-Expressionskassette nachgewiesen.

Bei 10 der molekular charakterisierten C—B-Kopplungen wurden kleine Deletionen zwischen zwei und 38 bp Umfang in und um die I-SceI-Schnittstelle gefunden (Abbildung 3.6). Für mehrere Kopplungsereignisse wurden kleine Mikro-

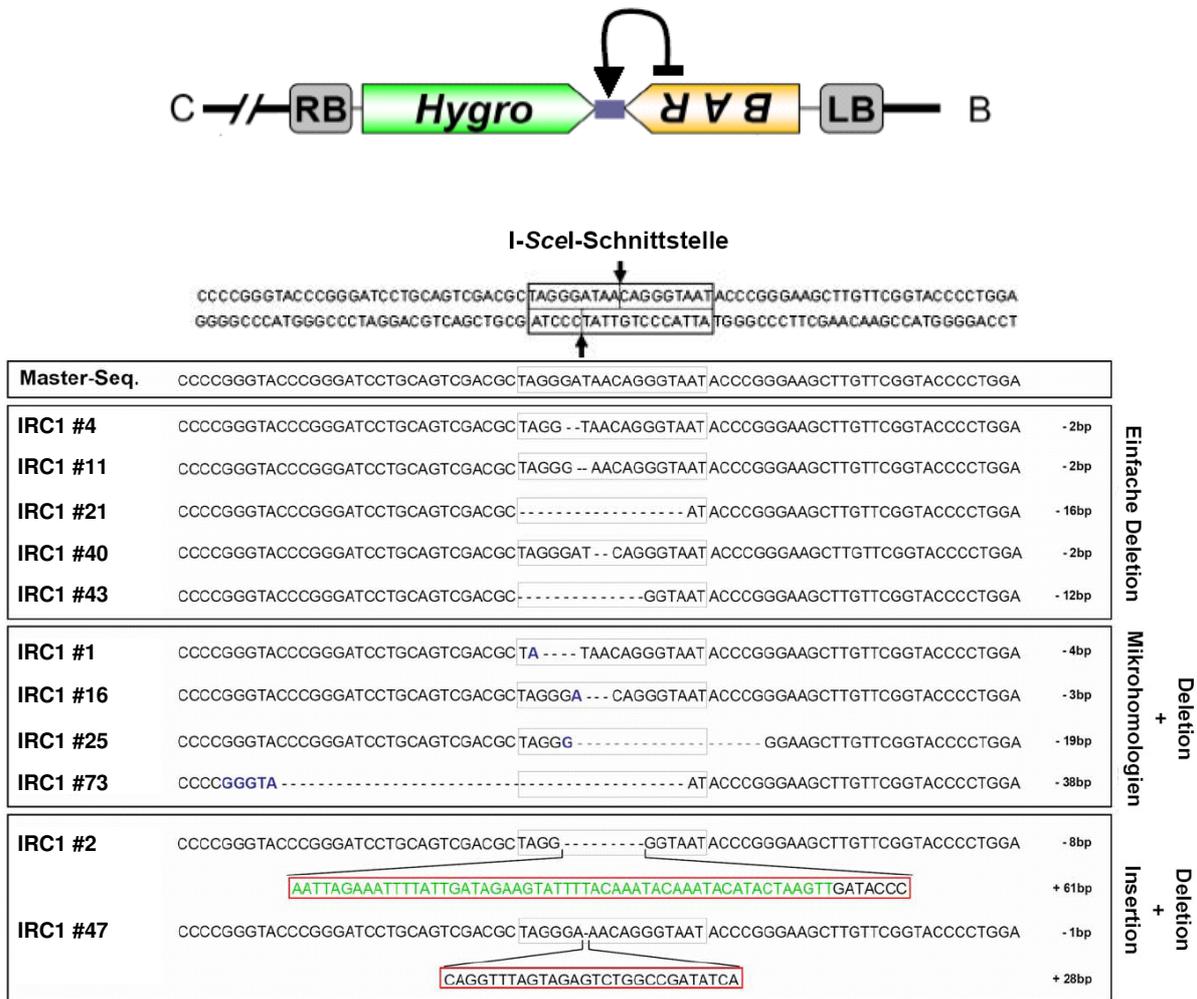


Abbildung 3.6: Sequenz-Analyse der rekombinanten Kopplungen C—B. Dargestellt sind rekombinante Kopplungen der Transgene B und C, welche durch NHEJ zwischen den beiden I-SceI-Schnittstellen aufgetreten sind. Zur Erleichterung der Interpretation wird angenommen, beide Enden seien über eine einfache Ligation gekoppelt worden, was zur Restaurierung einer funktionellen I-SceI-Schnittstelle führen würde (Mastersequenz oben, die Schnittstelle ist grau umrahmt). Es wurden drei unterschiedliche Klassen von rekombinanten Kopplungen gefunden: in fünf Fällen wurde die I-SceI-Schnittstelle durch kleine Deletionen von 2 – 16 bp Umfang partiell zerstört. Für vier andere Linien wurde gefunden, dass verschiedene Deletionen bis zu 38 bp auftraten und Mikrohomologien (blaue Buchstaben) für die Reparatur verwendet wurden. Eine dritte Klasse von Rekombinationsereignissen wird durch die Linien IRC1 #2 and IRC1 #47 repräsentiert, bei welchen neben Deletionen von 8 bp bzw. 1 bp Insertionen (rot eingerahmt) von 61 bp bzw. 28 bp auftraten. Anhand von Sequenz-Analysen konnte gezeigt werden, dass 54 Nukleotide der 61 bp umfassenden Insertion von einem Stück Transgen-Sequenz 38 Nukleotide 3' der I-SceI-Schnittstelle in gleicher Orientierung inkorporiert wurden (siehe Skizze oben). Die Herkunft der 28 Nukleotide umfassenden Insertion bei der Linie IRC1 #47 konnte nicht aufgeklärt werden.

homologien von einem bis fünf Nukleotiden gefunden, welche die Verknüpfung der Bruchenden begünstigt haben können. Bei zwei der sequenzierten C—B-Kopplungen wurden neben Deletionen innerhalb der I-SceI-Schnittstelle auch

Insertionen von 28 bzw. 61 bp gefunden. Die Herkunft der größeren inserierten Sequenz konnte identifiziert werden: es handelt sich hierbei um einen Teil des CaMV35S Terminators am 3´-Ende des *BAR*-Gens, welcher 42 bp von der I-SceI-Schnittstelle entfernt liegt. Diese Sequenz wurde bei der Rekombination in gleicher Orientierung zwischen die Bruchenden kopiert (Abbildung 3.6). Die Herkunft der 28 bp umfassenden Insertion konnte nicht geklärt werden, da in der Genbank keinerlei homologe Sequenzen gefunden werden konnten. Für die Linien IRC1 #14, IRC1 #52 und IRC1 #65 konnte die C—B-Kopplung mittels PCR nicht nachgewiesen werden.

3.1.6 Vererbung der neuen Kopplungen

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob die durch Rekombination entstandenen neuen Kopplungen den Mendel'schen Regeln gehorchend vererbt werden. Hierzu wurde Saatgut von 19 regenerierten rekombinanten Pflanzen auf MS-Kanamycin Medium ausgesät und hinsichtlich des Segregationsverhaltens getestet. In 13 Fällen wurde das neu entstandene Merkmal „Kanamycin-Resistenz“ gemäß den Mendel'schen Regeln vererbt (Tabelle 3.2). Dies bedeutet, dass die untersuchten Nachkommen jeweils eine Kopie des durch Translokation entstandenen Resistenzgens erhalten haben. Bei zwei untersuchten Linien (IRC1 #7 und IRC1 #14) waren alle Nachkommen resistent gegen Kanamycin, was auf zwei unabhängige Translokationen in den entsprechenden Genomen hindeutet. Solche Ereignisse können auftreten, da wie oben beschrieben etwa 30 % der für das Experiment eingesetzten Pflanzen homozygot für pTL waren. In diesen Linien lagen daher die Transgene A—B und C—D jeweils homozygot vor. Kommt es zwischen beiden unabhängig voneinander zu reziproken Translokationsereignissen, so kann eine 100 %-ige Kanamycinresistenz der Nachkommen erklärt werden. In weiteren vier Fällen waren wenige bzw. etwa die Hälfte aller Nachkommen resistent gegen Kanamycin (Linien IRC1 #18, IRC1 #27, IRC1 #47 und IRC1 #65). Saatgut dieser vier Linien wurde daher unter selektionsfreien Bedingungen auf MS-Medium angezogen. Aus jeweils 20 Pflanzen wurde von diesen Linien genomische DNA isoliert und einer PCR mit der Primerkombination KIH2 und KIR1 unterzogen. Für jede Linie konnte bei 75 % der untersuchten Pflanzen die Kanamycin-Resistenzgen-spezifische Bande nachgewiesen werden (χ^2 -Test, $P = 0,05$). Da das von den Mendel'schen Regeln abweichende Segregationsverhalten dieser Linien nur phänotypisch, nicht jedoch genotypisch auftritt, kann angenommen werden, dass ein

Tabelle 3.2: Segregation des rekombinanten Phänotyps Kanamycin-Resistenz. Tabak-Samen der F₂-Generation von 19 rekombinanten IRC1-Linien wurden auf MS-Medium mit 50 µg/l Kanamycin ausgesät. Etwa drei Wochen später wurde die Anzahl resistenter bzw. sensitiver Pflanzen bestimmt. Anhand des χ^2 -Tests ($P = 0,05$) wurde überprüft, ob das rekombinante Merkmal Kanamycin-Resistenz einer den Mendel'schen Regeln gehorchenden 3:1-Aufspaltung folgt. Bei 13 von 19 Linien wurde eine solche Segregation gefunden. Bei den Linien IRC1 #7 und #14 waren 100 % der Pflanzen resistent gegen Kanamycin. Auffällig wenige resistente Pflanzen wurden bei den Linien IRC1 #18, #27, #47 und #65 gefunden. Zur Erläuterung dieser sechs Fälle siehe Kapitel 3.1.6.

Linie	resistent	sensitiv	χ^2 -Test
IRC1 #1	32	11	+
IRC1 #2	55	18	+
IRC1 #4	58	24	+
IRC1 #7	40	0	—
IRC1 #11	57	23	+
IRC1 #12	41	15	+
IRC1 #14	75	0	—
IRC1 #16	64	25	+
IRC1 #18	10	41	—
IRC1 #21	59	19	+
IRC1 #25	31	15	+
IRC1 #27	7	79	—
IRC1 #35	61	17	+
IRC1 #40	33	15	+
IRC1 #43	74	21	+
IRC1 #47	46	45	—
IRC1 #52	66	29	+
IRC1 #65	52	54	—
IRC1 #73	70	22	+

Silencing-Phänomen die Expression des rekombinanten Resistenzgens bei einem Teil der Pflanzen unterbindet.

Die Vererbung der zweiten rekombinanten Kopplung (C—B) wurde ebenfalls mittels Segregations-Analyse überprüft. Hierzu wurde aus jeweils 20 Kanamycin-resistenten Pflanzen der Linien IRC1 #2, #4, #16, #21, #43, #47 und #73 DNA isoliert und durch PCR mit der Primerkombination Hyg1 und BarS auf das Vorhandensein der C—B-Kopplung getestet. Unter der Annahme, dass die beiden neuen rekombinanten Transgene nicht gekoppelt miteinander vererbt werden, wurde eine 3:1-Aufspaltung bezüglich der C—B-Verknüpfung gemäß den Mendel'schen Regeln erwartet. Dies konnte für alle untersuchten Linien gezeigt werden (χ^2 -Test). Unter der Voraussetzung, dass für alle Linien dieselbe reziproke Translokation stattgefunden hat, lassen sich die gewonnenen Daten zusammenfassen: insgesamt konnte von

140 getesteten Pflanzen bei 107 das C—B-typische PCR-Signal gefunden werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die beiden rekombinanten Verknüpfungen in der Tat nicht gekoppelt vererbt werden und dass die C—B-Kopplung mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit einer 3:1-Aufspaltung gehorcht ($\chi^2 = 0,152381$).

3.1.7 Southern Blot-Analyse

Für eine genauere Untersuchung der rekombinanten Linien wurden Southern Blots durchgeführt (Kapitel 2.14.8). Hierzu wurde genomische DNA aus Einzelpflanzen isoliert, welche geselbstete Nachkommen der rekombinanten Linien waren. Daher können in diesen Einzelpflanzen teilweise die ursprünglichen parental Merkmale (Transgenteile A—B und C—D) nicht mehr nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der rekombinanten A—D-Kopplung wurde die isolierte DNA mit *Hind*III gespalten und nach dem Blotten mit einer Kanamycin-Resistenzgen-spezifischen radioaktiven Sonde hybridisiert (Abbildungen 2.1 und 3.2). Durch diese Strategie lassen sich durch HR bzw. NHEJ zustande gekommene A—D-Kopplungen leicht unterscheiden. Für HR-vermittelte Kopplungen kann ein 1,9 kb großes KanamycinResistenzgen-spezifisches Signal gefunden werden, wogegen NHEJ-Ereignisse ein 2,7 kb großes *Hind*III-Fragment ergeben. Für die Linie 1-12, welche zur Etablierung des vorliegenden experimentellen Systems verwendet worden war, wird bei diesem Vorgehen ein für das Transgen pTS spezifisches 3,4 kb großes *Hind*III-Fragment nachgewiesen. Dieses wird ebenfalls für die parentale Linie IRC1 gefunden, bei welcher jedoch zusätzlich ein für das Transgen pTL spezifisches 1,1 kb großes *Hind*III-Fragment auftritt (Abbildungen 3.2 und 3.7).

Für die untersuchten Pflanzen der beiden rekombinanten Linien IRC1 #7 (1) und IRC1 #12 (2) wurde ausschließlich das 2,7 kb große *Hind*III-Fragment gefunden. In beiden Linien muss daher die Rekombination zwischen den Transgenteilen A und D durch NHEJ erfolgt sein. Außerdem kann die zweite parentale C—D-Kopplung nicht nachgewiesen werden. Dies ist wie oben beschrieben darauf zurück zu führen, dass es sich bei den untersuchten Pflanzen um geselbstete Nachkommen der rekombinanten Pflanzen handelt, bei denen die parental bzw. rekombinanten Merkmale segregieren. So wurden für eine weitere untersuchte Nachkommen-Pflanze der Linie IRC1 #12 [Bezeichnung IRC1 #12 (1)] sowohl die parental

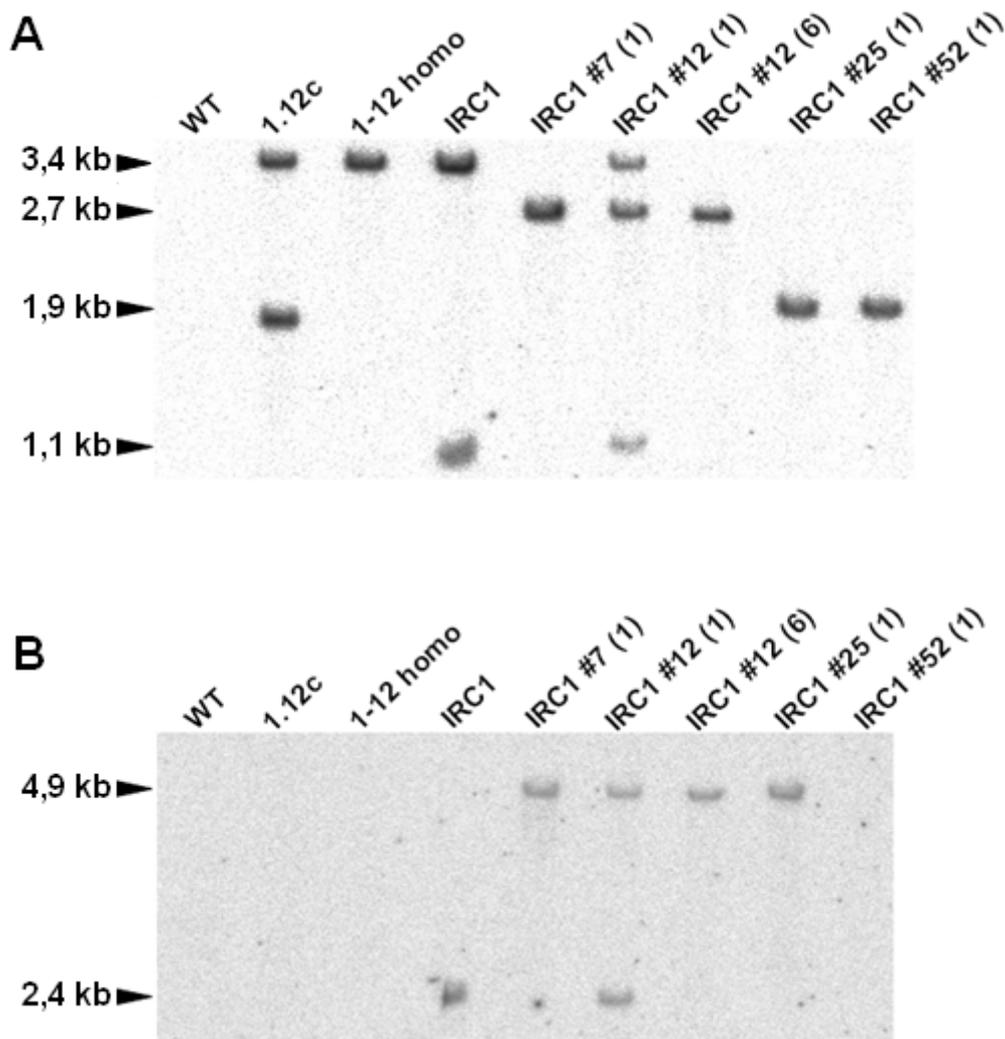


Abbildung 3.7: Southern Blot Analyse zum Nachweis der rekombinanten Kopplungen.

(A) *Hind*III-gespaltene genomische DNA wurde mit einer Kanamycin-spezifischen Sonde hybridisiert. Wildtyp-Tabak (WT) diente als Negativkontrolle, während die Linien 1.12c und 1-12 homo als Positivkontrollen eingesetzt wurden (siehe Puchta *et al.*, 1996). Sowohl für die ursprüngliche Linie 1-12 homo (homozygot für pTS) und die parentale Linie IRC1 kann ein 3,4 kb großes Kanamycin-spezifisches Fragment nachgewiesen werden. Für IRC1 wird zusätzlich ein 1,1 kb großes Fragment detektiert, welches dem *Hind*III-Fragment von pTL entspricht (Abbildung 3.1). Die für die parentalen Transgene typischen Banden können auch in der rekombinanten Linie IRC1 #12 (1) gefunden werden, wobei das zusätzliche bei 2,7 kb detektierte Signal die über NHEJ erfolgte Kopplung zwischen den Transgen-Hälften A und D nachweist (Abbildung 3.2). Für die anderen rekombinanten Linien werden ausschließlich die neuen Kopplungen zwischen A und D nachgewiesen, wobei die 2,7 kb großen Banden bei den Linien IRC1 #7 (1) und IRC1 #12 (6) repräsentativ für NHEJ-vermittelte Verknüpfungen der Transgenteile A und D sind. Bei den anderen beiden rekombinanten Linien IRC1 #25 (1) und IRC1 #52 (1) wird ausschließlich ein 1,9 kb großes Fragment detektiert, welches zeigt, dass in diesen beiden Fällen die rekombinante Kopplung durch homologe Rekombination zustande gekommen ist (Abbildung 3.2). (B) *Eco*RV-gespaltene genomische DNA wurde mit einer *BAR*-spezifischen Sonde hybridisiert. Als Kontrollen dienten wie in (A) beschrieben WT, Linie 1.12c sowie 1-12 homo. Für die parentale Linie IRC1 ist ein 2,4 kb Fragment detektierbar, welches dem *Eco*RV-Fragment aus pTL entspricht (Abbildung 3.2). Dieses Fragment wird auch in der rekombinanten Linie IRC1 #12 (1) gefunden, welche zusätzlich eine neue 4,9 kb große Bande aufweist. Diese ist repräsentativ für die Kopplung der Transgenteile C und B (Abbildung 3.2). Alle anderen rekombinanten Linien weisen ausschließlich diese 4,9 kb Bande auf, welche nur für die durch NHEJ zustande gekommene Kopplung der Transgenhälften C und B detektiert werden kann.

Banden als auch die rekombinante Bande nachgewiesen. Im Falle der Linien IRC1 #25 und IRC1 #52 wurden jeweils 1,9 kb große *HindIII*-Fragmente detektiert. Dies zeigt, dass bei beiden Linien die A—D-Kopplung durch homologe Rekombination zu Stande gekommen ist. Diese Bande wurde auch für die Linie 1.12c nachgewiesen, bei welcher das Kanamycin-Resistenzgen nach *I-SceI*-Expression in der Linie 1-12 durch Gene Targeting restauriert wurde (Puchta *et al.*, 1996). Beide untersuchten Pflanzen [IRC1 #25 (1) und IRC1 #52 (1)] weisen zudem keine parentalen Banden mehr auf.

Zusätzlich zur Bestätigung der rekombinanten Kopplung zwischen den Transgenteilen A und D sollten auch die PCR-Daten hinsichtlich der neuen Kopplung zwischen B und C mittels Southern Blot-Analyse untermauert werden. Innerhalb der Transgensequenz pTL befinden sich zwei *EcoRV*-Schnittstellen (Abbildung 3.2). Eine davon liegt nahe der Right Border (Transgenteil A) und die andere ist innerhalb des *BAR*-Gens lokalisiert (Transgenteil B). Genomische DNA der rekombinanten Pflanzen, welche bereits für den mit der Kanamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde hybridisierten Blot verwendet worden waren, wurde mit *EcoRV* gespalten und mit einer *BAR*-spezifischen Sonde hybridisiert. Hierbei lässt sich das wie oben beschrieben für pTL typische 2,4 kb große *EcoRV*-Fragment in der parentalen Linie IRC1 nachweisen. Nahe des Integrationsortes des T-DNA pTS im Tabakgenom befindet sich 5' der Right Border (Transgenteil C) eine weitere *EcoRV*-Schnittstelle. Kommt es zu einer Kopplung der zwischen B und C, sollte ein 4,9 kb großes *EcoRV*-Fragment mit der *BAR*-Sonde nachweisbar sein. Dieses konnte in der Tat für die Pflanzen IRC1 #7 (1), IRC1 #12 (2) und IRC1 #25 (1) nachgewiesen werden. Im Falle von IRC1 #12 (1) konnten zusätzlich zu der für die rekombinante Kopplung C—B typischen 4,9 kb Bande das auf die parentale Linie IRC1 zurück zu führende 2,4 kb Fragment nachgewiesen werden. Dies stimmt mit dem oben beschriebenen Ergebnis des *HindIII*-Kanamycin-Blots überein. Im Falle der untersuchten Linien IRC1 #52 (1) konnte kein *BAR*-spezifisches Signal detektiert werden. Für diese Linie war bereits der PCR-Nachweis der C—B-Kopplung negativ. Dies wäre auch durch eine Rekombination des Transgenteils B mit einem anderen Substrat im Tabakgenom zu erklären. In diesem Falle müsste jedoch ein *BAR*-spezifisches *EcoRV*-Fragment unbekannter Größe detektiert werden. Das Fehlen dieser Bande lässt sich nur durch eine mit der Prozessierung des Doppelstrangbruches verbundene Deletion größeren Umfangs erklären, bei der erhebliche Teile des Resistenzgens oder auch ein Teil des

betroffenen Chromosoms verloren gegangen sind. Insgesamt wurden in dem beschriebenen *EcoRV-BAR*-Blot neun Linien untersucht, welche bei der C—B-spezifischen PCR ein Signal ergeben hatten. In allen Fällen konnte dies auch mittels Southern Blot verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

3.2 Etablierung eines neuartigen Systems zur *in vivo* Quantifizierung NHEJ-vermittelter DSB in *Arabidopsis*

3.2.1 Konzept des experimentellen Systems

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiges experimentelles System in *Arabidopsis thaliana* etabliert, welches die Quantifizierung von induzierten DSB-Reparaturereignissen durch NHEJ *in vivo* erlaubt (Abbildung 3.8). Das System basiert auf einer T-DNA, welche das GUS-Reportergen (*uidA*) enthält. Dieses ist durch einen von zwei direkt oder invers zueinander orientierten Erkennungssequenzen für die Meganuklease I-Scel flankierten Bereich von seinem Promotor separiert, wodurch eine Expression der β -Glucuronidase unterbunden wird. Der durch die I-Scel-Schnittstellen flankierte Bereich kodiert als Selektionsmarker ein Gentamycin-Resistenzgen (*aacC1*).

Durch die Expression der Meganuklease I-Scel kann in einem Genom, welches diese T-DNA enthält, das Gentamycin-Resistenzgen *in vivo* ausgeschnitten werden. Der dadurch entstehende Doppelstrangbruch kann mangels homologer Sequenzen ausschließlich durch NHEJ repariert werden. Kommt es dabei zu keinen großen Deletionen oder Insertionen, gelangt der Promotor in unmittelbare Nähe des *uidA*-ORFs, was eine Expression der β -Glucuronidase zur Folge hat. Dies kann durch eine einfache histochemische Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 3.8). Die inverse Orientierung der beiden I-Scel-Schnittstellen zueinander verhindert, dass einfache Ligationereignisse zwischen den Bruchenden detektiert werden (Kapitel 2.14.2). Um ggf. in weiter führenden Arbeiten den Beitrag von Ligationereignissen zur DSB-Reparatur quantifizieren zu können, wurde zudem auch ein Konstrukt kloniert, bei welchem die beiden I-Scel-Schnittstellen in gleicher Orientierung zueinander das Gentamycin-Resistenzgen flankieren. Zur Unterscheidung der beiden Konstrukte werden im Folgenden die Vektoren bzw. Linien mit „n“ oder „i“ für gleiche bzw. inverse Orientierung der I-Scel-Schnittstellen zueinander gekennzeichnet.

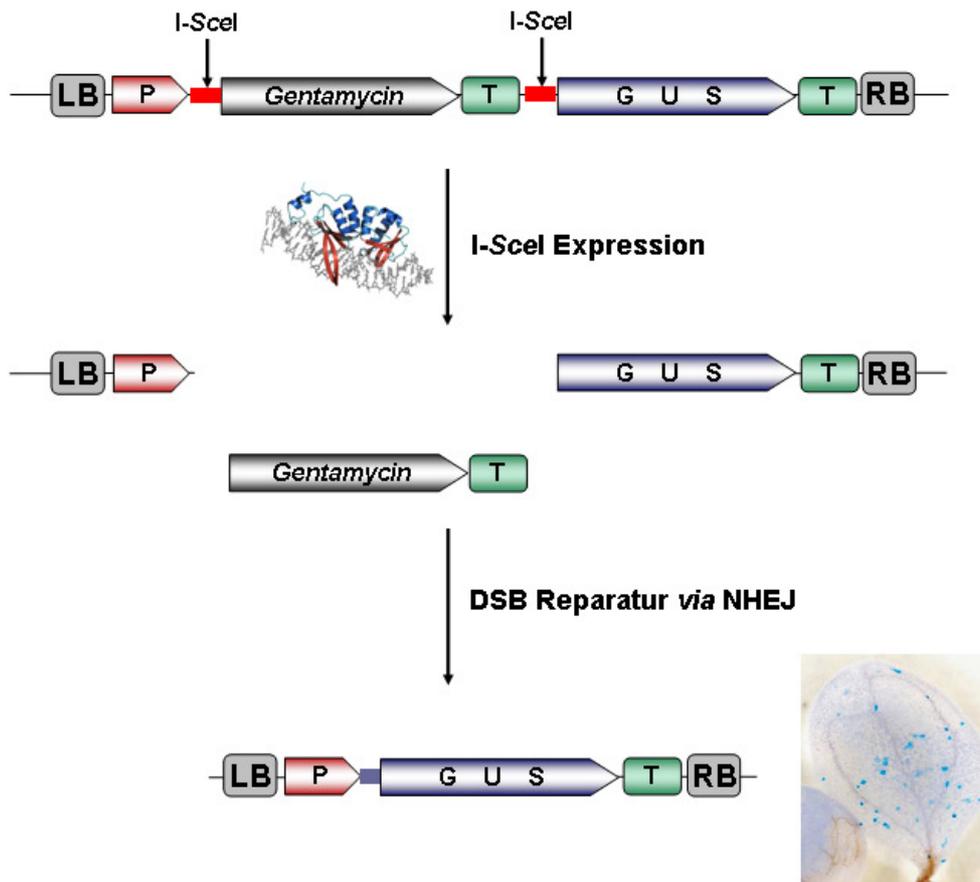


Abbildung 3.8: Konzept des experimentellen Systems zur *in vivo* Quantifizierung von NHEJ-Ereignissen. Die T-DNA enthält als Selektionsmarker ein Gentamycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors (P). Der ORF des Selektionsmarkers zusammen mit dem Terminator (T) werden von Erkennungssequenzen der Meganuklease I-SceI flankiert. Downstream davon ist der ORF des GUS-Reportergens *uidA* lokalisiert. In der dargestellten Ausgangssituation wird das Reportergen nicht exprimiert, da der Promotor zu weit entfernt ist und zudem der Terminator des Selektionsmarkers vor dem GUS-Startcodon liegt. Durch Expression der Meganuklease I-SceI kann das 1,6 kb große Gentamycin-Terminator-Fragment *in vivo* aus dem Transgen ausgeschnitten werden. Eine Reparatur des resultierenden Doppelstrangbruchs kann mangels Sequenz-Homologien ausschließlich über NHEJ erfolgen. Dadurch kann der 35S-Promotor in unmittelbare Nähe des GUS-Reportergens gelangen und dessen Expression herbeiführen. Die Präsenz der β -Glucuronidase kann mittels histochemischer Färbung durch das Auftreten blauer Sektoren gezeigt werden. Dies erlaubt eine einfache Quantifizierung apparenter NHEJ-Ereignisse. Die Darstellung des an dsDNA gebundenen I-SceI-Proteins als Bestandteil dieser Abbildung wurde freundlicherweise von CELLECTIS SA (Romainville Cedex, Frankreich) genehmigt.

3.2.2 Etablierung des experimentellen Systems

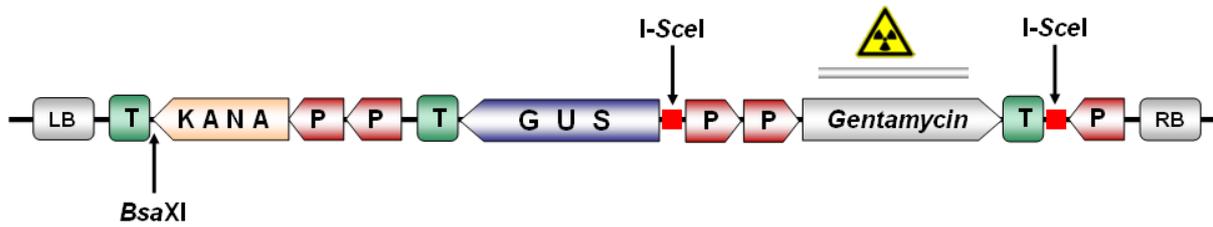
Zunächst wurden die Pflanzentransformationsvektoren wie in Kapitel 2.14.2 detailliert beschrieben assembliert. Hierzu wurde in das Plasmid pGUS23 (Puchta & Hohn, 1991a) zwischen CaMV35S Promotor und *uidA*-Reportergen der von I-SceI-Schnittstellen flankierte Gentamycin-Selektionsmarker kloniert. Aus den resultierenden Vektoren pMP1-n bzw. pMP1-i wurde der gesamte Bereich als *EcoRI*-Fragment in den Vektor pPZP111 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) kloniert, welcher als

Selektionsmarker für transgene Pflanzen ein Kanamycin-Resistenzgen kodiert, welches zusätzlich verwendet werden kann. Das entstandene Konstrukt wird im Folgenden als pNHEJ-n bzw. pNHEJ-i bezeichnet. Mit Hilfe des Agrobakterienstammes GV3101 wurde die T-DNA von pNHEJ in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Durch Selektion mittels Gentamycin wurden 56 für das Konstrukt NHEJ-n bzw. 55 für das Konstrukt NHEJ-i transgene Pflanzen (T₁-Generation) gefunden. Diese wurden einzeln vermehrt und ihre Nachkommen (T₂-Generation) einer Segregationsanalyse auf GM-Medium mit 20 mg/l Gentamycin unterzogen. Hierdurch sollten jene Linien identifiziert werden, welche die T-DNA an einem einzelnen Locus im Genom integriert haben. Für 19 NHEJ-n bzw. 11 NHEJ-i Linien wurde eine den Mendel'schen Regeln gehorchende 3:1-Aufspaltung gefunden. Von jeder dieser Linien wurden 10 Pflanzen durch Selbstung vermehrt und das Saatgut einer Pflanze (T₃-Generation) jeweils einzeln geerntet. Die Samen aller 19 bzw. 11 Linien wurden auf GM-Gentamycin-Medium ausgebracht, um für das NHEJ-Konstrukt homozygote Nachkommen zu finden. Nach der Etablierung homozygoter NHEJ-Linien (im Folgenden als NHEJ n-1 bis NHEJ n-19 bzw. NHEJ i-1 bis NHEJ i-11 bezeichnet) sollten diese mittels Southern Blot-Analysen eingehender charakterisiert werden.

3.2.3 Charakterisierung des Assay-Systems

Eine Voraussetzung für die zweifelsfreie Interpretation von Rekombinations-Ereignissen ist das Vorliegen einer einzelnen und vollständigen Kopie der T-DNA im Genom der Versuchspflanze. Daher wurde aus Pflanzen aller homozygoten NHEJ-Linien genomische DNA extrahiert und nach einer auf die Fragestellung angepassten Restriktionsspaltung in Southern Blots mit spezifischen radioaktiven Sonden hybridisiert (Abbildung 3.9). In einem ersten Ansatz wurde die DNA nahe der Left Border mit *Bsa*XI gespalten und mit einer Gentamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde hybridisiert. In einem weiteren Ansatz wurde die DNA mit *Hind*III gespalten und mit drei verschiedenen Sonden (Kanamycin-, GUS-, Gentamycin-spezifisch) hybridisiert. Von den untersuchten 19 NHEJ-n Linien erfüllten nur vier bzw. von den 11 NHEJ-i Linien drei die beschriebenen Kriterien. Einige repräsentative Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 zusammengefasst. Für die Linien NHEJ n-15, n-17 sowie NHEJ i-1, i-2 und i-7 konnte gezeigt werden, dass die T-DNA als Einzelkopie („single copy“) und vollständig im Genom der Pflanzen vorliegt (Abbildung 3.10).

A



B

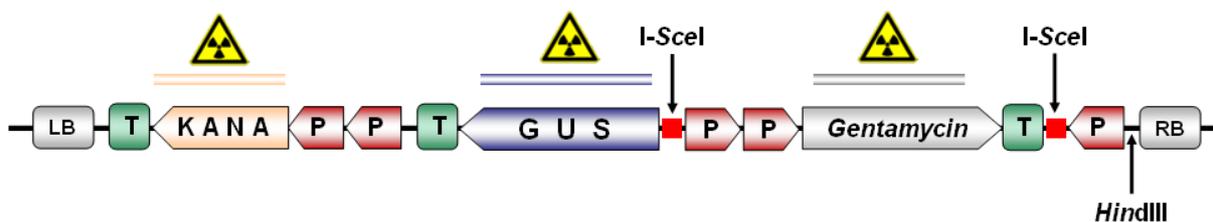


Abbildung 3.9: Identifizierung von Linien mit einer vollständigen Kopie der NHEJ-T-DNA. Genomische DNA von 3:1 aufspaltenden Linien wurde (A) mit *BsaXI* bzw. (B) mit *HindIII* geschnitten und nach dem Southern Blotting mit verschiedenen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Durch die Hybridisierung der *BsaXI*-geschnittenen DNA mit einer Gentamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde (A) sowie durch Hybridisierung der *HindIII*-geschnittenen DNA mit einer Kanamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde (B) können Linien identifiziert werden, welche eindeutig nur eine Kopie der T-DNA tragen. Diese Strategie (Schnitt LB-seitig, Sonde RB-seitig und *vice versa*) erlaubt es, auch Tandem-artig in gleicher oder inverser Orientierung zueinander ins Genom integrierte Konstrukte zu erkennen. Die weitere Hybridisierung der *HindIII*-geschnittenen DNA mit einer GUS- bzw. Gentamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde ermöglicht zudem eine Kontrolle auf die Vollständigkeit der T-DNA. Hierbei werden unabhängig von der verwendeten Sonde eine für jede Linie charakteristische Bande (*HindIII*-Fragment) detektiert. P: CaMV35S-Promotor, T: CaMV35S-Terminator, KANA: Kanamycin-Resistenzgen *nptII*, GUS: β -Glucuronidase-Reportergen *uidA*, Gentamycin: *aacC1*-Resistenzgen.

In einem weiteren Ansatz wurde die Funktionalität der I-SceI-Schnittstellen in den „single copy“ Linien überprüft. Hierzu wurde extrahierte DNA der fünf verbliebenen Linien mit *EcoRI* alleine oder mit *EcoRI* und I-SceI gespalten und nach erfolgtem Southern Blotting mit einer „Gentamycin-spezifischen“ Sonde hybridisiert (Abbildung 3.11). Im Falle der *EcoRI*-Restriktionsspaltung hybridisiert die „Gentamycin-Sonde“ mit einem etwa 4,5 kb großen T-DNA internen Fragment. Wird wie beschrieben die extrahierte DNA mit *EcoRI* und I-SceI gespalten, kann mit der „Gentamycin-Sonde“ das 1,6 kb große I-SceI-Fragment detektiert werden. In der Tat konnte für alle fünf NHEJ-Linien die Funktionalität beider I-SceI-Schnittstellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Zusätzlich zu den vorhergesagten Banden

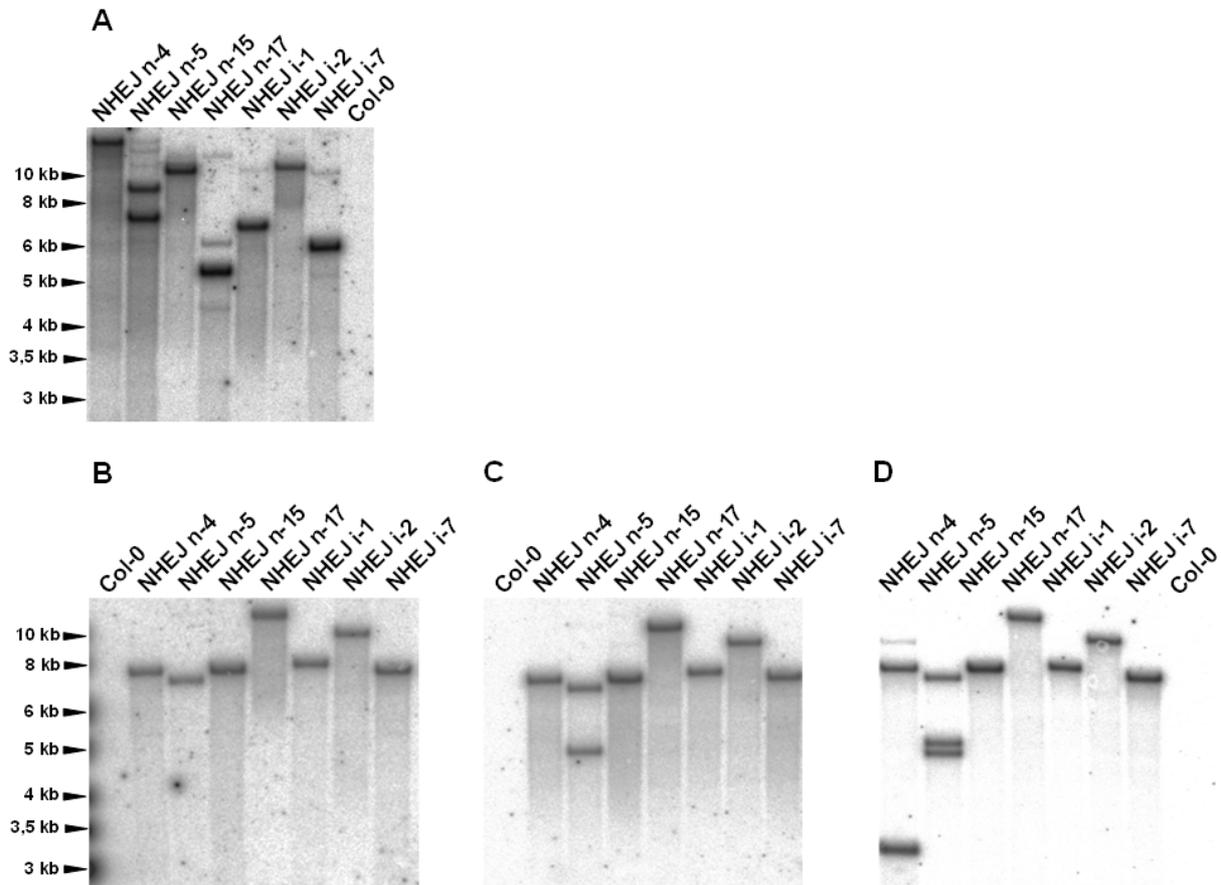


Abbildung 3.10: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung von „single copy“ NHEJ-Linien. Etwa 10 µg genomische DNA verschiedener NHEJ-Linien sowie von *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen (Ökotyp Col-0, Negativkontrolle) wurde mit *Bsa*XI bzw. *Hind*III geschnitten und nach erfolgtem Southern Blotting wie in Abbildung 3.9 beschrieben mit verschiedenen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. (A) *Bsa*XI-geschnittene genomische DNA wurde mit einer Gentamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde hybridisiert. Bis auf die Linie NHEJ n-5 (zwei Banden) zeigen alle anderen Linien eine deutliche Bande unterschiedlicher Größe. (B-D) *Hind*III-geschnittene DNA wurde (B) mit einer Kanamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde hybridisiert. Alle untersuchten Linien weisen ein einziges Signal unterschiedlicher Größe auf. Dieselben *Hind*III-spezifischen Banden werden auch unter Verwendung einer (C) GUS-spezifischen bzw. (D) einer Gentamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde gefunden. Dies zeigt, dass die T-DNA in allen sieben Linien zumindest einmal vollständig integriert ist. Ein zusätzliches *Hind*III-spezifisches Fragment tritt bei der Linie NHEJ n-5 nach Hybridisierung mit der GUS-spezifischen Sonde auf (C). Für diese Linie werden in dem mit einer Gentamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde hybridisierten Blot (D) zwei zusätzliche Banden gefunden. Zudem tritt auch für NHEJ n-4 ein ca. 3,3 kb großes *Hind*III-spezifisches Fragment auf. Die zusätzlich gefundenen Banden (NHEJ n-4 und n-5) zeigen, dass Teile der T-DNA zwei- bzw. dreifach vorliegen.

wurden auch Fragmente von ca. 2,2 kb und 3,9 kb detektiert. Diese lassen sich darauf zurückführen, dass die enzymatische Aktivität von I-SceI nicht ausreicht, um alle im Restriktionsspaltungsansatz präsente Schnittstellen zu spalten. Wird nur jeweils eine der beiden Erkennungssequenzen durch die Meganuklease prozessiert, lassen sich die beiden zusätzlichen Banden folgendermaßen erklären (Abbildung 3.11): schneidet I-SceI nur die RB-seitige Erkennungssequenz, wird mit der

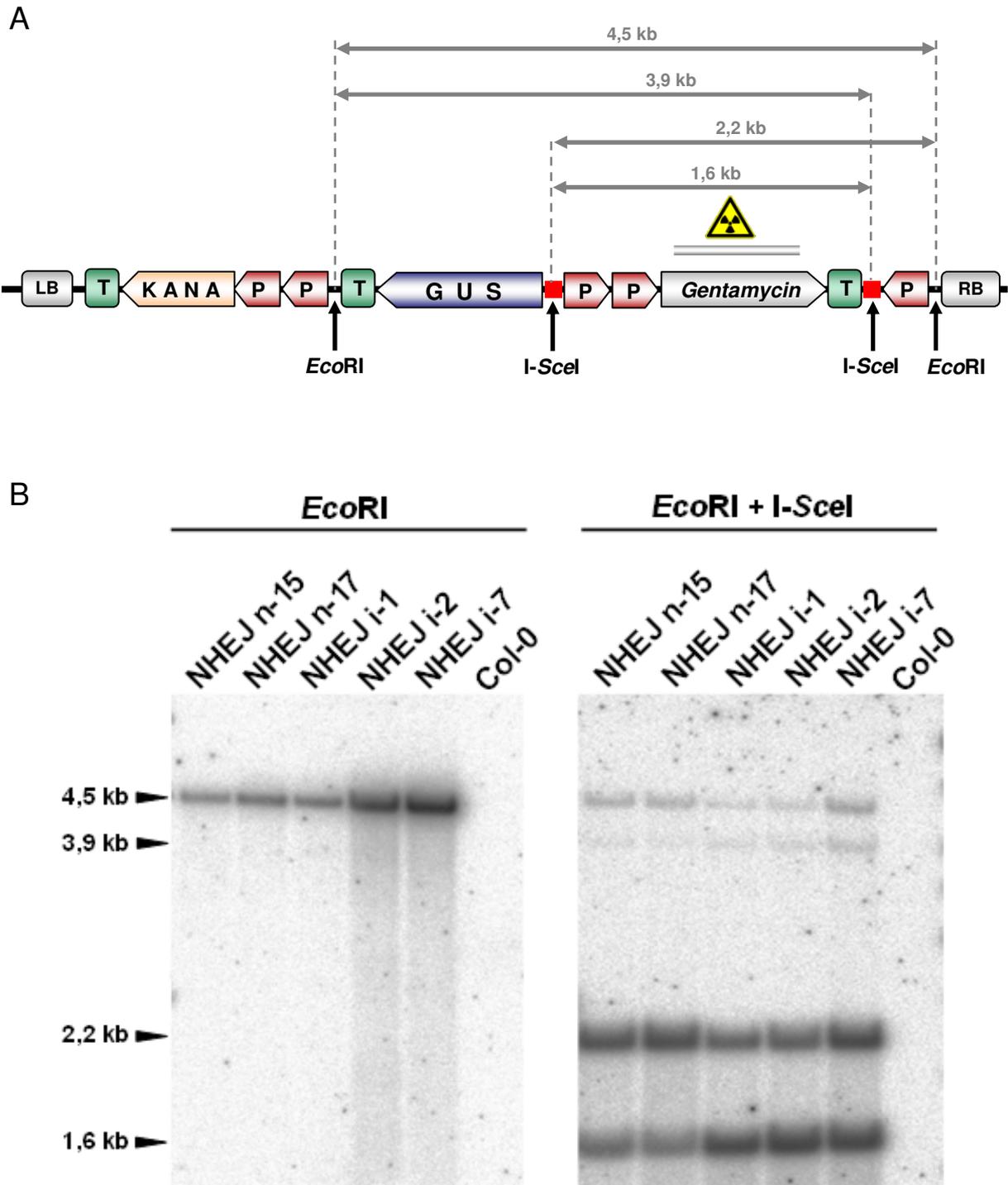


Abbildung 3.11: Nachweis der Funktionalität der I-SceI-Schnittstellen. NHEJ-Linien, welche eine vollständige Einzelkopie der T-DNA tragen, wurden hinsichtlich der Funktionalität der I-SceI-Schnittstellen getestet. Hierzu wurde genomische DNA dieser Linien sowie von *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen (Ökotyp Col-0, Negativkontrolle) mit *EcoRI* bzw. mit *EcoRI* und I-SceI geschnitten (A) und nach erfolgtem Southern Blotting mit einer Gentamycin-Resistenzgen-spezifischen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (B). Für alle fünf Linien kann im Falle einer Restriktionsspaltung mit *EcoRI* ein charakteristisches 4,5 kb großes Fragment mit der Gentamycin-Resistenzgen-spezifischen Sonde nachgewiesen werden. Wird die DNA dieser Linien zusätzlich mit I-SceI geschnitten, lassen sich neben der ursprünglichen 4,5 kb Bande drei weitere bei 3,9 kb, 2,2 kb und 1,6 kb detektieren. Letztere repräsentiert das von den I-SceI-Erkennungssequenzen flankierte Gentamycin-Resistenzgen (A). Schneidet I-SceI nur eine der beiden Erkennungssequenzen, werden mit der verwendeten Sonde die beiden 2,2 kb bzw. 3,9 kb großen Banden gefunden.

Die Bestimmung des T-DNA-Integrationsortes bei der Linie NHEJ n-17 gelang bisher nicht.

Im Rahmen der Charakterisierung des beschriebenen experimentellen Systems sollte gezeigt werden, ob tatsächlich eine Zunahme detektierbarer Rekombinations-Ereignisse durch die Expression der Meganuklease I-SceI nachgewiesen werden kann. Hierzu wurden homozygote Pflanzen der Linien NHEJ n-15, n-17 sowie NHEJ i-1, i-2 und i-7 mit Pflanzen gekreuzt, welche homozygot für ein I-SceI-Expressionskonstrukt sind (Abbildung 3.13). Letztere wurden bereits vor mehreren Jahren am IPK Gatersleben etabliert. Die verwendete Linie (AR-I-SceI) enthält mehr als eine Kopie des Expressionskonstruktes und der Integrationsort der T-DNA ist nicht bekannt. Durch verschiedene Experimente, welche innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte jedoch zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Meganuklease in den Pflanzen der Linie AR-I-SceI exprimiert wird und *in vivo*

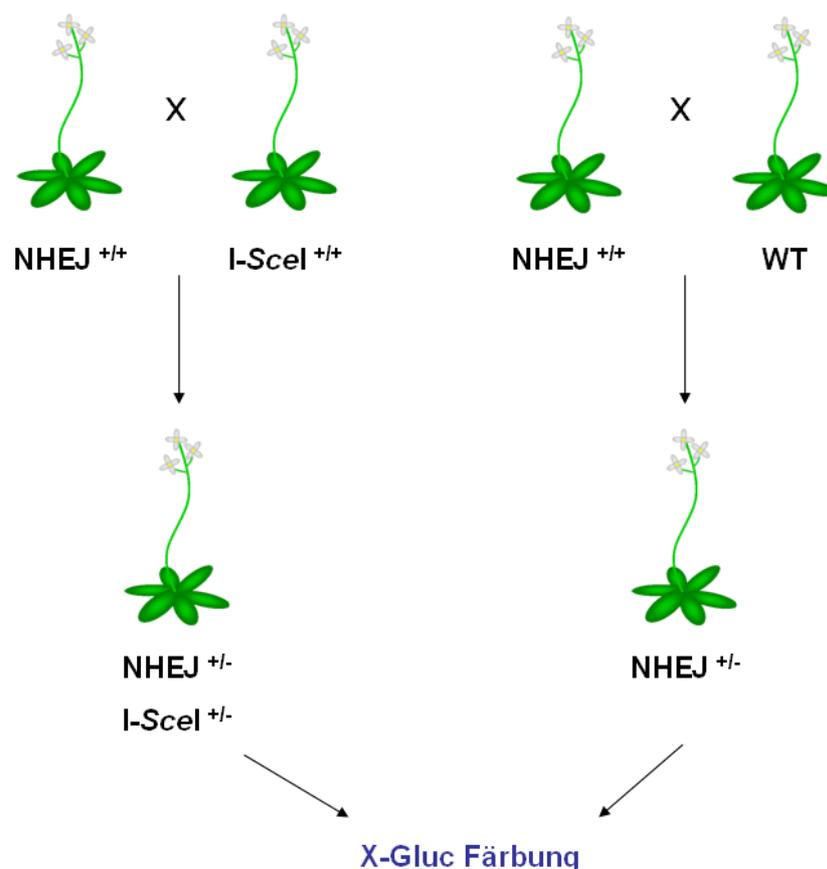


Abbildung 3.13: Kreuzungen zur Charakterisierung der NHEJ-Linien. Homozygote NHEJ-Linien (n-15, n-17, i-1, i-2 und i-7) wurden mit einer für das I-SceI-Expressionskonstrukt AR-I-SceI homozygoten Linie bzw. mit Wildtyp-Pflanzen als Kontrolle gekreuzt. Die Nachkommen (hemizygot für die NHEJ-T-DNA) wurden für 17 Tage auf GM-Medium angezogen und anschließend histochemisch gefärbt.

Tabelle 3.3: Auswertung der histochemischen Färbung. In der Tabelle sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. F₁-Pflanzen aus der Kreuzung homozygoter NHEJ-Linien mit dem Wildtyp bzw. mit der homozygoten I-SceI-Expressionslinie wurden histochemisch gefärbt und die Anzahl apparenter Rekombinations-Ereignisse bestimmt. n_{WT}: Anzahl untersuchter Pflanzen der Kontroll-Population (Genotyp NHEJ^{+/+}), Σ aRE_{WT}: mittlere Summe apparenter Rekombinations-Ereignisse pro Pflanze (Genotyp NHEJ^{+/+}), n_{I-SceI}: Anzahl untersuchter Pflanzen der Population mit dem Genotyp NHEJ^{+/+} I-SceI^{+/+}, Σ aRE_{I-SceI}: mittlere Summe apparenter Rekombinations-Ereignisse pro Pflanze (Genotyp NHEJ^{+/+} I-SceI^{+/+}), IF: Induktionsfaktor (Σ aRE_{I-SceI} / Σ aRE_{WT}), MW: Mittelwert der drei (zwei IFs), SD: Standardabweichung.

Linie	n _{WT}	Σ aRE _{WT}	n _{I-SceI}	Σ aRE _{I-SceI}	IF	SD
NHEJ n-15	23	0,48	25	8,44	17,7	19,1 (3,7)
	21	0,71	22	11,73	16,4	
	28	0,57	25	13,32	23,3	
NHEJ n-17	16	2,75	21	14,19	5,2	10,4 (7,3)
	18	1,72	21	12,43	7,2	
	24	0,50	21	9,33	18,7	
NHEJ i-1	23	1,70	24	22,79	13,4	30,0 (27,0)
	23	1,65	30	25,30	15,3	
	22	0,36	21	22,24	61,2	
NHEJ i-2	25	1,40	24	21,33	15,2	18,1 (7,1)
	20	0,95	30	12,20	12,8	
	30	0,30	28	7,86	26,2	
NHEJ i-7	10	0,80	28	19,96	25,0	23,1 (2,7)
	17	1,24	20	26,15	21,2	
	17	0,00	23	17,91	n.d.	

I-SceI-Erkennungssequenzen schneiden kann (nicht publizierte Daten). Die Nachkommen aus der oben beschriebenen Kreuzung wurden auf GM-Medium angezogen und nach 17 Tagen einer histochemischen Färbung unterzogen. Als Kontrolle dienten hierbei Nachkommen einer Kreuzung der jeweiligen NHEJ-Linie mit dem *Arabidopsis*-Wildtyp (Col-0). Für alle fünf Linien konnte eine signifikante Zunahme apparenter NHEJ-Rekombinations-Ereignisse in Gegenwart des I-SceI-Expressions-Konstruktes gezeigt werden (Tabelle 3.3). Diese Zunahme wird durch den so genannten Induktionsfaktor wiedergegeben, welcher wie in Kapitel 2.14.7.1 beschrieben berechnet wird.

3.2.4 Analyse von rekombinanten Verknüpfungen

Nachdem eindeutig gezeigt werden konnte, dass die neu etablierten Assay-Linien nach I-SceI-vermittelter Induktion von DSBs eine quantifizierbare Zunahme apparenter Rekombinations-Ereignisse aufweisen, sollten exemplarisch einige rekombinante Verknüpfungen innerhalb der T-DNA nachgewiesen werden.

Hierzu wurde genomische DNA aus Pflanzen mit den Genotypen [NHEJ n-17^{+/-} I-SceI^{+/-}] bzw. [NHEJ i-2^{+/-} I-SceI^{+/-}] isoliert. Mittels PCR und den Primern GUS23 FW2 und GUS23 RV1, welche jeweils 200 Nukleotide 5´ bzw. 3´ des induzierten DSBs binden, wurde der rekombinante Bereich amplifiziert. Da in jedem Genom einer Zelle, in welcher die Gentamycin-Resistenzkassette aus der T-DNA herausgeschnitten wurde, unterschiedliche Verknüpfungen der freien DSB-Enden durch NHEJ zustande kommen können, werden durch die PCR verschiedene Produkte angereichert. Um diese einzeln untersuchen zu können, wurden die erhaltenen Fragmente in den Vektor pGEM[®]-T kloniert (siehe Kapitel 2.14.3). Von den erhaltenen Klonen wurden 14 sequenziert und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 zusammengefasst.

Es wurden insgesamt 10 Klone für den Genotyp [NHEJ n-17^{+/-} I-SceI^{+/-}] sequenziert (Abbildung 3.14 A). In fünf Fällen wurden identische Klone gefunden, bei welchen die kompatiblen I-SceI-Schnittstellen durch einfache Ligation miteinander verknüpft wurden (Abbildung 3.14 [A1]). In zwei weiteren Fällen (Abbildung 3.14 [A2 und A3]) wurden Deletionen von 25 bzw. 101 Nukleotiden gefunden. In beiden Fällen waren beide geschnittenen I-SceI-Schnittstellen vollständig verloren gegangen. Im Falle von Klon [A3] reicht die Deletion bis 10 Nukleotide vor das Start-Codon des GUS-Gens. Zusätzlich konnten bei einer genaueren Analyse der rekombinanten Sequenz Hinweise darauf gefunden werden, dass die Reparatur des induzierten DSBs in diesem Falle durch einen SSA-ähnlichen Mechanismus unter Verwendung von Mikrohomologien stattgefunden hat (zur Erklärung: siehe Abbildung 4.1). Im Falle des Klons [A4] wurde eine intakte I-SceI-Schnittstelle sowie eine Insertion von sieben Nukleotiden 5´ davon gefunden, die auf eine Sequenzduplikation zurück zu führen ist. Zusätzlich wurde eine Einzel-Nukleotid-Insertion gefunden. In zwei weiteren Klonen [A5 und A6] wurden Deletionen von 76 bzw. 80 Nukleotiden gefunden, welche von einer Sequenz-Insertion von 10 bzw. 164 Nukleotiden begleitet waren. Im Falle von [A5] wurde DSB-Ende auf Seite des GUS-Reportergens erheblich nukleolytisch prozessiert, wogegen anhand der Sequenz des anderen Endes noch zwei Nukleotide aus der ursprünglichen Promotor-seitigen I-SceI-Schnittstelle zu identifizieren waren. Außerdem fand möglicherweise eine partielle Sequenz-Duplikation statt, da ein Teil der inserierten Sequenz identisch mit einer Nukleotid-Abfolge 5´ des prozessierten DSBs ist. Bei Klon [A6] wurde eine 80

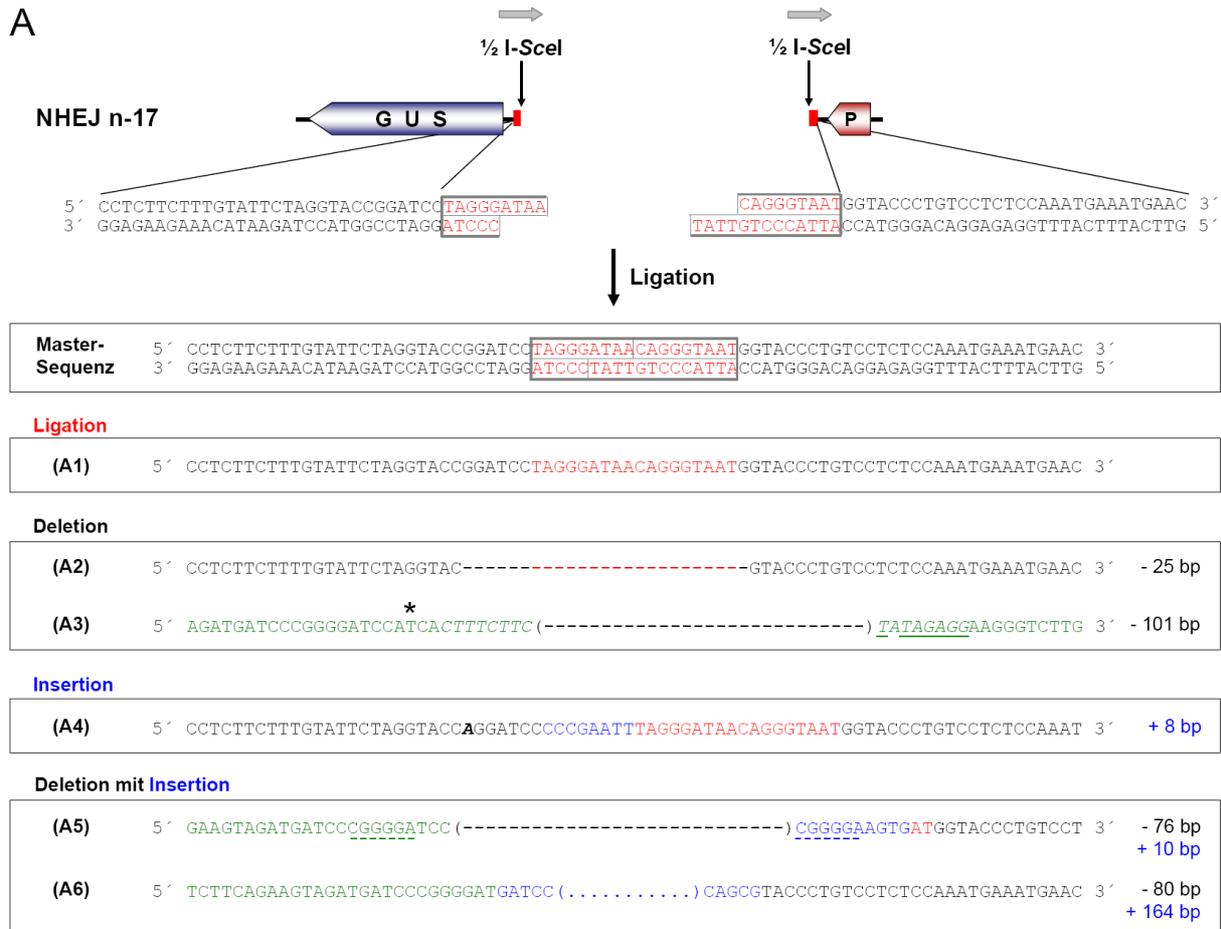
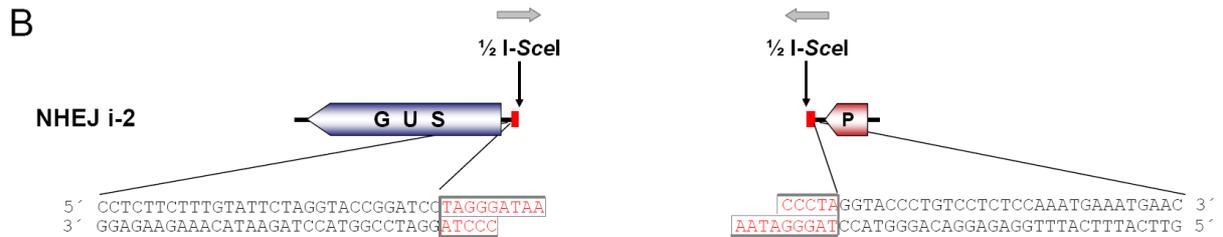


Abbildung 3.14: Sequenz-Analyse von NHEJ-vermittelten Rekombinations-Ereignissen. Dargestellt sind Sequenzen von Rekombinations-Ereignissen, welche nach *in vivo* Exzision der Gentamycin-Resistenzkassette (siehe Abbildungen 3.8 und 3.13) aus den Linien NHEJ n-17 (A) bzw. NHEJ i-2 amplifiziert wurden. Die hierfür verwendeten Primer liegen ca. 200 Nukleotide von den I-SceI-Schnittstellen entfernt (nicht eingezeichnet). Es sind jeweils 30 an die geschnittenen I-SceI-Erkennungssequenzen (in rot) angrenzenden Nukleotide gezeigt. Sind auf Grund von Deletionen Sequenzen dargestellt, welche 5'- bzw. 3' dieses Bereiches liegen, sind diese in grün dargestellt. Das Start-Codon des GUS-Gens ist 57 Nukleotide 5'-der linken Schnittstelle lokalisiert. Insetierte Nukleotide sind in blau dargestellt. (A) Aus Pflanzen mit dem Genotyp NHEJ n-17 ^{+/+} I-SceI ^{+/+} konnten vier verschiedenen Klassen von Rekombinations-Ereignissen amplifiziert werden. Hierbei wurden fünf identische Ereignisse sequenziert, bei denen die DSB-Enden durch einfache Ligation miteinander verknüpft wurden (A1). In zwei weiteren Fällen wurden Deletionen von 25 bp (A2) bzw. 101 bp (A3) Länge gefunden. Bei der 25 bp Deletion (A2) wurde die gesamte I-SceI-Schnittstelle zerstört und es wurden 6 Nukleotide aus dem angrenzenden 5'-Bereich sowie ein Nukleotid aus dem 3'-Bereich deletiert. Bei der 101 bp Deletion (A3) gingen zusätzlich zu der I-SceI-Schnittstelle 46 Nukleotide aus dem angrenzenden 5'-Bereich und 37 Nukleotide aus dem 3'-Bereich verloren. Die Position des GUS-Startcodons ist durch ein Sternchen gekennzeichnet. Die kursiv geschriebenen Nukleotide sind Reste von direkten Sequenzwiederholungen, wobei eine nicht-perfekte Mikrohomologie (unterstrichen) wahrscheinlich durch einen SSA-ähnlichen Mechanismus zur DSB-Reparatur beigetragen hat (zur Erklärung: siehe Abbildung 4.1). Im Falle von (A4) liegt eine intakte I-SceI-Schnittstelle vor. Davor befindet sich eine 7 Nukleotide umfassende Insertion, die in gleicher Orientierung im Ausgangskonstrukt (pNHEJ-n) vor der Promotor-seitigen-I-SceI-Schnittstelle liegt (CCCGAATTT-[I-SceI-Schnittstelle], der unterstrichene Bereich wurde dupliziert). Ausserdem wurde eine Einzelnukleotid-Insertion (A, fett kursiv) gefunden. Eine weitere Klasse von Rekombinations-Ereignissen weist neben Deletionen auch Insertionen verschiedener Größe auf (A5 und A6). Im Falle von (A5) wurden die geschnittenen I-SceI-Erkennungssequenzen 5' vollständig und 3' bis auf zwei Nukleotide abgebaut. Zudem gingen in der 5'-Region weitere 58 Nukleotide verloren (insgesamt wurden 76 bp deletiert). Es wurden 10 Nukleotide inseriert, wobei die unterstrichelten Nukleotide (CGGGGA) möglicherweise dupliziert wurden. (A6) Die gesamte I-SceI-Schnittstelle sowie 60 Nukleotide im angrenzenden 5' bzw. 2 Nukleotide im 3'-Bereich wurden deletiert.



Insertion

(B1)	5' CCTCTTCTTTGTATTCTAGGTACCGGATCC TAGGGATAA CCCTAGGTACCCTGTCCCTCTCCAAATGAAATGAAC 3'	+ 1 bp
------	---	--------

Deletion mit Insertion

(B2)	5' CCTCTTCTTTGTATTCTAGGTACCGGATCC TAGGGATTATCCCTAGGTACCCTGTCCCTCTCCAAATGAAATGAAC 3'	- 2 bp + 3 bp
(B3)	5' CCTCTTCTTTGTATTCTAGGTACCGGATCC TAGGGATA CCCTAGGTACCCTGTCCCTCTCCAAATGAAATGAAC 3'	- 1 bp + 1 bp
(B4)	5' CTTCTGTAGAGGTCTT (.....) TGTTCACATCAATCCACTTGCTTTGAAGACGT 3'	- 157 bp + 60 bp

Abbildung 3.14: Fortsetzung. Die 164 bp umfassende inserierte Sequenz (A6) entstammt Teilen der T-DNA (Kanamycin-Resistenzgen) und wurde in inverser Orientierung zur ursprünglichen Sequenz in den Bruch kopiert. (B) Aus Pflanzen mit dem Genotyp NHEJ i-2^{+/-} I-SceI^{+/-} konnten zwei verschiedenen Klassen von Rekombinations-Ereignissen amplifiziert und sequenziert werden. Auf Grund der inversen Orientierung der I-SceI-Schnittstellen kann eine direkte Ligation nicht stattfinden. In einem Fall (B1) wurde ein einzelnes Nukleotid inseriert. In den anderen drei Fällen traten Deletionen in Kombination mit Sequenz-Insertionen auf. (B2) Eine zwei Nukleotide umfassende Deletion wurde von der Insertion dreier Nukleotide begleitet. (B3) Ein Nukleotid (A) wurde deletiert und durch ein anderes (T) ersetzt. (B4) Die geschnittenen I-SceI-Erkennungssequenzen wurden vollständig abgebaut. Zusätzlich wurden 38 Nukleotide aus dem angrenzenden 5'-Bereich sowie 101 Nukleotide aus dem 3'-Bereich deletiert (Gesamt-Deletion: 157 bp). Die 60 Nukleotide umfassende Insertion ist Teilen eines CaMV35S-Promotors aus der T-DNA zuzuordnen.

Nukleotide umfassende Deletion gefunden, wobei die inserierten 164 Nukleotide aus Teilen der Konstrukt-T-DNA in den Bruch kopiert wurden.

Für den Genotyp [NHEJ i-2^{+/-} I-SceI^{+/-}] wurden insgesamt vier Klone sequenziert (Abbildung 3.14 B). In einem Fall [B1] wurde ein einziges Nukleotid zwischen die beiden nicht kompatiblen geschnittenen I-SceI-Schnittstellen eingefügt. In den anderen drei Fällen wurden neben Deletionen auch Insertionen gefunden. Bei Klon [B2] wurden drei Nukleotide in den DSB eingebaut, wobei die zwei Nukleotide umfassende Deletion nur die Reporter-gen-seitige Schnittstelle betraf. Im Falle von [B3] wurde ebenfalls an demselben Überhang ein Nukleotid deletiert und eines inseriert. Bei Klon [B4] wurden größere Sequenzveränderungen gefunden. Beide Bruchenden wurden weit über die I-SceI-Erkennungssequenz hinaus abgebaut. Bei der folgenden Reparatur wurden 60 Nukleotide eingefügt, die identisch zu der Sequenz der CaMV35S-Promotors ist. Da mehr als ein Promotor Bestandteil des

Assay-Konstruktes ist, kann die Herkunft dieser Insertion nicht abschließend geklärt werden.

4 Diskussion

4.1 Reparatur von zwei simultanen DSBs im Genom somatischer Zellen von Tabak

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein experimentelles System *in planta* etabliert, welches es erlaubt, die Fragestellung zu untersuchen, wie zwei nicht gekoppelte simultane Doppelstrangbrüche in somatischen Pflanzenzellen repariert werden. Diese Untersuchung wurde bewusst in Tabak durchgeführt, da diese Spezies amphidiploid ist und angenommen werden kann, dass Genom-Veränderungen daher eher toleriert werden, als bei diploiden Pflanzen-Spezies. *Nicotiana tabacum* besitzt ein 48 Chromosomen umfassendes Genom ($2n$) und ist wahrscheinlich auf eine Kreuzung zwischen *Nicotiana sylvestris* ($2n = 24$) und *Nicotiana tomentosiformis* ($2n = 24$) (Goodspeed, 1954; Gerstel, 1960 & 1963) bzw. einem Hybriden aus *Nicotiana otophora* ($2n = 24$) und *N. tomentosiformis* (Ren & Timko, 2001) zurückzuführen. Die Genomgröße beträgt 4500 Mbp (Tobacco Genome Initiative, NC State University).

4.1.1 Analyse von Translokations-Ereignissen

Auf Grund der Konzeption des experimentellen Systems (Abbildung 3.2) wurde hinsichtlich einer einfachen Translokation zwischen zwei nicht miteinander gekoppelten Transgenen selektiert und zusätzlich untersucht, ob es zu einer Kopplung zwischen den verbleibenden Bruchenden kommt.

Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass nach *in vivo* Induktion zweier gleichzeitiger DSBs Translokationen im Genom von Tabak stattfinden können. Die Verwendung eines Introns in den beiden Transgen-Hälften, auf deren Kopplung selektiert werden kann, ermöglichte es dabei, die Häufigkeit verschiedener Reparatur-Ereignisse miteinander zu vergleichen (siehe Abbildung 3.2). Auf Grund dieser experimentellen Voraussetzungen konnte im selben Ansatz die relative Verwendung von NHEJ und HR zur Verknüpfung der Transgen-Hälften A und D verglichen werden.

Etwa 40 % der rekombinanten Kopplungen zwischen den Transgen-Hälften A und D wurden durch homologe Rekombination erzeugt, während etwa 60 % durch NHEJ verknüpft wurden (Tabelle 3.1). Diese Werte werden durch die von Siebert &

Puchta (2002) bei einer vergleichenden Untersuchung von HR und NHEJ in Tabak gefundenen Daten gestützt (Kapitel 1.4.5). In dieser Studie wurde gezeigt, dass im Falle unmittelbar an den DSB angrenzender Sequenz-Homologien etwa 30 % der induzierten Brüche durch HR repariert werden können. Die experimentelle Situation sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Studie von Siebert & Puchta (2002) ist vergleichbar: in beiden Fällen lagen unmittelbar an den induzierten DSBs angrenzend Sequenz-Homologien. Im Falle der früheren Studie betrug die Länge des homologen Bereiches 557 Nukleotide und war als „direct repeat“ in *cis* positioniert. In der vorliegenden Arbeit umfasste die Sequenzhomologie zwischen den Transgen-Hälften A und D 847 Nukleotide, welche allerdings in *trans* zueinander lokalisiert waren. Offensichtlich ist dennoch eine sehr effiziente Verknüpfung mittels HR durch den SSA-Mechanismus möglich (Li *et al.*, 1984 & 1990; Kapitel 1.2.1 und Abbildung 1.5).

Die Länge der Sequenz-Homologie und der Grad der Sequenz-Identität ist hierbei ebenfalls von Bedeutung. So konnten Elliott *et al.* (2005) bei Untersuchungen zu Chromosomen-Translokationen intronischer *Alu*-Elemente in Säugerzellen zeigen, dass abhängig von der Anzahl nicht übereinstimmender Nukleotide die Art der DSB-Verknüpfung beeinflusst werden kann. Im Falle einer Sequenz-Divergenz von 20 % wurden die mittels I-SceI induzierten Brüche ausschließlich durch NHEJ repariert, wogegen perfekte Homologien nahezu ausschließlich durch SSA repariert wurden. In diesem Zusammenhang konnten Opperman *et al.* (2004) in *Arabidopsis* zeigen, dass bereits eine einzige Fehlpaarung („Mismatch“) unabhängig von ihrer Position innerhalb einer von zwei identischen Sequenzwiederholungen von 618 bp Länge die HR durch SSA zu mehr als 66 % inhibiert. Diese Ergebnisse wurden von Li *et al.* (2004) bestätigt. Emmanuel *et al.* (2006) konnten zeigen, dass solche Fehlpaarungen, welche normalerweise sehr effizient zum Abbruch der HR führen, durch Mutation des MSH2-Gens von *Arabidopsis* toleriert werden können. Dies zeigt, dass auch die Mismatch-Reparatur (MMR) in die homologe Rekombination bei der Ausbildung der Heteroduplex-Struktur involviert ist (Übersicht in: Schofield & Hsieh, 2003). Eine Beteiligung der MMR-Maschinerie an der HR wurde bislang für verschiedene Organismen beschrieben (AtMLH1: Dion *et al.*, 2007; AtMSH2: Emmanuel *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Lafleuriel *et al.*, 2007; MSH2 in *Physcomitrella patens*: Trouiller *et al.*, 2006; *S. cerevisiae*: Sugawara *et al.*, 2004; Harrington & Kolodner, 2007; MutL in *E. coli*: Elez *et al.*, 2007).

Die hohe Effizienz der HR bei der rekombinanten Kopplung der Transgen-Hälften A und D ist sehr wahrscheinlich auf die Aktivität des SSA-Mechanismus (Li *et al.*, 1984 & 1990; Kapitel 1.2.1 und Abbildung 1.5) zurück zu führen. Wie in Kapitel 1.4 diskutiert, ist SSA in Pflanzen sehr effizient bei der extrachromosomalen Rekombination zwischen identischen Sequenzen (Puchta & Hohn, 1991a, b; Bilanz *et al.*, 1992; De Groot *et al.*, 1993; Übersicht in Puchta & Meyer, 1994). Auch die Reparatur von DSBs durch NHEJ wird häufig durch einen SSA-ähnlichen Mechanismus katalysiert, bei welchem kurze Sequenz-Homologien zwischen den Rekombinationspartnern verknüpft werden (Lehman *et al.*, 1994; Nicolas *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1996; Gorbunova & Levy, 1997; Salomon & Puchta, 1998; Decottignies, 2007; Überblick in: Gorbunova & Levy, 1999; siehe auch Kapitel 1.4.5.3). SSA und SSA-ähnliche Mechanismen könnten daher die vorherrschenden Wege zur Reparatur von DSBs in höheren Eukaryoten sein – unabhängig davon, ob dabei zwei nahe beieinander liegende Bruchenden verbunden werden oder zwei nicht-gekoppelte, wie in der vorliegenden Studie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zudem, dass zwei gleichzeitig in einem Genom auftretende DSBs sowohl durch HR als auch durch NHEJ repariert werden können. Dies deutet darauf hin, dass in einer Zelle zum selben Zeitpunkt beide Arten der DSB-Reparatur ablaufen können. Daher kann angenommen werden, dass sowohl HR- als auch NHEJ katalysierende Proteine an den Bruch rekrutiert werden. Dieser Befund deckt sich mit neueren Publikationen, nach denen die Reparatur-Proteine um die DSB-Enden konkurrieren und abhängig von der Struktur der Bruchenden, benachbarter Sequenzen, weiteren vorhandenen Faktoren und übergeordneten Regulations-Mechanismen (Zellzyklus, Entwicklungsstadium, Umwelt-Einflüsse) zu einer Reparatur des DSBs führen (Preston *et al.*, 2006a, b; Johnson-Schlitz & Engels, 2006a, b & 2007; Engels *et al.*, 2007; Übersicht in: Wyman & Kanaar, 2006; siehe auch Kapitel 1.1 und 4.2.2)

4.1.2 Reziproke Translokationen im Tabak-Genom

Auf Grund der Konzeption des in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Systems konnte auf die Verknüpfung der zuvor nicht-gekoppelten Enden A und D selektioniert werden (Abbildung 3.2). Eine Selektion auf eine Kopplung der anderen beiden Transgen-Hälften war jedoch nicht möglich. Dennoch wurden in 16 von 19

untersuchten rekombinanten Linien, bei denen die Kopplung A—D zustande gekommen war, mittels PCR auch eine Verknüpfung der Transgen-Hälften C und B miteinander gefunden (Kapitel 3.1.5, Abbildung 3.5). Die Verknüpfung dieser Enden konnte mangels Sequenz-Homologien ausschließlich durch NHEJ ablaufen und zwar unabhängig davon, auf welche Weise die Kopplung A—D zu Stande kam. Hierbei wurden neben Ligations-Ereignissen, kleineren Deletionen auch Mikrohomologien identifiziert, welche zur Reparatur beigetragen haben dürften (Abbildung 3.6). Des Weiteren wurde in zwei der untersuchten Sequenzen „Filler“-DNA gefunden. Die untersuchten rekombinanten Verknüpfungen sind somit repräsentativ für die in Kapitel 1.4 beschriebenen Eigenschaften des NHEJ *in planta*.

Neun der 16 Linien wurden mit Hilfe von Southern-Blot-Analysen detailliert untersucht (Abbildung 3.7). Während die Kopplung A—D durch das Auftreten *Kanamycin*-Resistenzgen-spezifischer Banden von 1,9 kb (HR) bzw. 2,7 kb (NHEJ) nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.7 A), zeigt eine 4,9 kb große *BAR*-Resistenzgen-spezifische Bande (Abbildung 3.7 B) die Kopplung der Transgen-Hälften C—B und folglich die reziproke Translokation an. Damit konnte für die so untersuchten Linien bewiesen werden, dass es sich um echte reziproke Translokationen handelt. Im Falle der Linie IRC1 #52 (1) konnte weder mittels PCR eine Kopplung zwischen C—B gezeigt werden, noch trat eine *BAR*-Resistenzgen-spezifische Bande im Southern Blot auf (Abbildung 3.7 B). Da in einem weiteren Blot (Daten nicht gezeigt) mit einer *Hygromycin*-Resistenzgen-spezifischen Sonde ein Signal bei dieser Linie detektiert wurde, kann das Fehlen des *BAR*-spezifischen Signals dadurch erklärt werden, dass das detektierbare Ende der Transgen-Hälfte B durch exonukleolytische Prozessierung verloren gegangen ist.

Unabhängig davon, wie die Reparatur der beiden simultan induzierten DSBs abläuft, sind nur solche Ereignisse für die Genom-Evolution von Bedeutung, welche erfolgreich die Meiose durchlaufen können (Kapitel 4.1.5). Das hier vorgestellte System zeigt eindeutig, dass reziproke Translokationen im Genom fixiert und über die Keimbahn an Nachkommen weitergegeben werden können. Mittels Segregationsanalysen (Kapitel 3.1.6) konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass bei den meisten analysierten Linien beide rekombinanten Kopplungen unabhängig voneinander und gemäß den Mendel'schen Regeln vererbt werden. Die 100 %-ige

Kanamycin-Resistenz der beiden rekombinanten Linien IRC1 #7 und IRC1 #14 (Tabelle 3.2) kann durch unabhängige Translokations-Ereignisse erklärt werden, da ein Teil der für diese Studie verwendeten Pflanzen homozygot für beide Transgene waren. In vier weiteren Fällen konnte eine signifikant reduzierte Kanamycin-Resistenz der rekombinanten Linien gefunden (Tabelle 3.2) und auf ein Silencing-Phänomen zurück geführt werden. In der Tat werden solche Ereignisse in der Literatur für Resistenzgene kodierende Selektionsmarker *in planta* beschrieben (Meza *et al.*, 2001).

Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Reparatur zweier simultaner DSBs mit hoher Effizienz durch reziproke Translokation ablaufen kann, so müssen bestimmte Limitierungen des verwendeten experimentellen Systems bedacht werden.

4.1.3 Limitierungen des experimentellen Systems

Mit Hilfe des hier vorgestellten Systems können nur Ereignisse nachgewiesen werden, bei welchen die resultierenden genomischen Rearrangements erfolgreich die mitotische Teilung durchlaufen können. Daher ist es sehr gut möglich, dass weitere nicht-reziproke Ereignisse nach der Induktion der beiden DSBs aufgetreten sind, die resultierenden Genome während der Mitose jedoch nicht auf Tochterzellen aufgeteilt werden konnten und damit eine Regeneration von Pflanzen mit rekombinanten Ereignissen durch Kanamycin-Selektion nicht möglich war.

Auf diese Weise lassen sich die Ergebnisse bei den Linien IRC7 und IRC10 verstehen. Nach Inokulation von jeweils nahezu 2000 Tabak-Sämlingen beider Linien mit dem die I-SceI-Expressionskassette transferierenden Agrobakterienstamm wurde nicht ein einziges rekombinantes Ereignis gefunden (Tabelle 3.1). Auf Grund der Ergebnisse für die Linie IRC1 (84 rekombinante Ereignisse bei 1140 inokulierten Tabak-Sämlingen) ist es allerdings sehr viel wahrscheinlicher, dass auch in den Linien IRC7 und IRC10 reziproke Translokationen stattgefunden haben. Allerdings kann abhängig von der Orientierung der Transgene pTS und pTL in Bezug auf das Centromer eine Kopplung der selektierbaren Verknüpfung A—D zu azentrischen oder dizentrischen Chromosomen führen und das resultierende Genom aus diesem Grunde während der Mitose nicht korrekt aufgeteilt werden.

Eine weitere Limitierung des im Rahmen dieser Arbeit etablierten und getesteten Systems ist die Tatsache, dass das Tabakgenom bislang nicht sequenziert ist. Daher konnten die Insertions-Loci der verwendeten Transgene pTL und pTS nicht determiniert werden. Eine weitere Charakterisierung der induzierten Translokationen ist somit nicht möglich. Anhand der Segregations-Analysen (Kapitel 3.1.6) konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die rekombinanten Kopplungen unabhängig voneinander vererbt werden. Dies kann entweder durch Integration der beiden Transgene auf verschiedenen Chromosomen oder aber auf demselben Chromosom in großem Abstand zueinander erklärt werden. In letzterem Falle würde eine reziproke Translokation eine Inversion innerhalb eines Chromosoms zur Folge haben. Da das Genom von *Nicotiana tabacum* aus 48 Chromosomen besteht, ist es jedoch viel wahrscheinlicher, dass beide Transgene auf verschiedenen Chromosomen integriert sind. In diesem Falle würde eine reziproke Translokation zu einem Austausch von Chromosomenarmen führen.

Ein weiterer die Analyse der Translokations-Ereignisse limitierender Faktor ist die Tatsache, dass alle 48 Tabak-Chromosomen etwa gleich groß sind und es keine Chromosomen-spezifischen Sonden gibt. Daher ist eine cytologische Untersuchung von Translokations-Ereignissen mittels FISH wie von Richardson & Jasin (2000) für ES-Zellen von Maus beschrieben (siehe Kapitel 4.1.5) nicht möglich.

Ein ebenfalls nicht zu vernachlässigender Faktor liegt in den inhärenten Eigenschaften des experimentellen Systems begründet. Charakteristika, wie die Art des DSBs (präzise Enden mit 3'-Überhängen, die direkt ligierbar sind; siehe Kapitel 1.4.4.2), die Integrations-Loci der Transgene im Genom, die Position der Sequenz-Homologien bezüglich der induzierten Brüche sowie die Länge und Sequenz-Identität der homologen Bereiche beeinflussen sehr wahrscheinlich den DSBR-Ausgang (Sugawara *et al.*, 2000; Preston *et al.*, 2002). Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten System konnte für definierte Bedingungen gezeigt werden, dass reziproke Translokationen in somatischen Zellen von Tabak sehr effizient stattfinden (siehe Kapitel 4.1.4). Die vorgenannten Faktoren beeinflussen jedoch die Reparatur zufällig simultan auftretender DSBs im Genom somatischer Pflanzenzellen. Zudem können Spezies-spezifische Unterschiede in der Prozessierung von DSB-Enden (Kirik *et al.*, 2000; Orel *et al.*, 2003) oder der Auflösung von Rekombinations-Intermediaten ebenfalls die Frequenz reziproker Translokationen bei simultan auftretenden DSBs

beeinflussen. Aus den vorliegenden Daten dieser Arbeit und Sequenzanalysen (*Arabidopsis*: Blanc *et al.*, 2000; *Brassica*: Udall *et al.*, 2005) kann jedoch geschlossen werden, dass reziproke Translokationen eine Triebkraft zur Evolution von Pflanzengenomen darstellen.

4.1.4 Bedeutung von Translokations-Ereignissen für die Genom-Evolution

Das in dieser Arbeit verwendete Transgen-Konstrukt pTS (Abbildung 3.2) war bereits von Puchta (1999) zur Untersuchung ektopischer Rekombination in somatischen Pflanzenzellen in Tabak verwendet worden (siehe Kapitel 1.4.5.1). In dieser Studie wurde gefunden, dass etwa einer von 1000 durch I-SceI induzierten DSBs durch ektopische HR repariert werden konnte (HR-Frequenz: 10^{-3} , siehe auch: Shalev & Levy, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden in weniger als 1200 Tabak-Sämlingen der Linie IRC1 durch I-SceI-Expression DSBs induziert und 84 unabhängige rekombinante Ereignisse erhalten (siehe Tabelle 3.1). Folglich finden zumindest in Kombination mit dem verwendeten zweiten Rekombinationssubstrat pTL (Abbildung 3.2) in der transgenen Linie IRC1 Translokationen etwa um zwei Größenordnungen häufiger statt als Genkonversionen durch ektopische HR. Dies bedeutet, dass im Falle zweier simultaner DSBs bei etwa 1 % der Fälle die verkehrten Enden miteinander gekoppelt werden können.

Solche Translokationen können zur Entstehung dizentrischer oder azentrischer Chromosomen führen und folglich die mitotische Zellteilung nicht durchlaufen. Diese Ereignisse würden demnach nicht fixiert und können nicht in die Keimbahn eingehen. Je nach Position der Bruchenden und der Art der Neuverknüpfung können aber auch Inversionen innerhalb eines Chromosoms oder reziproke Translokationen die Folge sein. In beiden Fällen entsteht ein neuer Genotyp, der abhängig von der Position der DSBs für die betroffene Zelle nicht notwendigerweise einen Nachteil darstellen muss. Kann die Mitose ungestört ablaufen, würden solche neuen Genotypen in somatischen Zellen fixiert werden (Walbot *et al.*, 1985). Ist ein erfolgreicher Ablauf der Meiose ebenfalls möglich, können diese Genom-Veränderungen in der Keimbahn fixiert und an die Nachkommen weitergegeben werden. Eventuell ist dabei die Möglichkeit zur Selbstung (Selbstkreuzung) ein weiterer Vorteil: treten diese Genom-Veränderungen in somatischen Zellen auf, müssen diese zunächst die erste „Hürde“ – die Mitose – überstehen, um im Genom somatischer Zellen fixiert zu werden.

Genomveränderungen, die diese „Vorselektion“ auf somatischer Ebene überstanden haben, können unter Umständen in die Keimbahn eingehen, die – wie eingangs diskutiert – bei Pflanzen erst spät determiniert wird (Walbot *et al.*, 1985). Läuft auch die Meiose ordnungsgemäß ab, entstehen Gameten, die diese Genomveränderung tragen. Eine Kreuzung mit einem anderen Genotyp kann möglicherweise dadurch erschwert bzw. eine Selbstung begünstigt werden. Auf diese Weise könnten auf Translokationen beruhende Genomveränderungen zur Spezifizierung beitragen. So zeigen Analysen des sequenzierten *Arabidopsis*-Genoms (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), dass in der Tat Translokationen im Laufe der Genom-Evolution stattgefunden haben (Blanc *et al.*, 2000; für *Brassica napus*: Udall *et al.*, 2005).

Reziproke Translokationen treten häufig im Zusammenhang mit Leukämien, Lymphomen und Sarkomen beim Menschen auf und werden als kausales Ereignis für die Tumorigenese diskutiert (Tycko & Sklar, 1990; Rabbitts, 1994; Mitelman *et al.*, 1997a, b; Deininger & Batzer, 1999; Finette, 2006; Weinstock *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden in den vergangenen Jahren experimentelle Studien mit Translokations-Modellen in verschiedenen Organismen durchgeführt.

4.1.5 Vergleich mit Untersuchungen bei anderen Spezies

Auch Untersuchungen in anderen Spezies zeigen, dass das gleichzeitige Auftreten von DSBs in Folge von Reparatur-Ereignissen zu reziproken Translokationen führen kann (Übersicht in: Weinstock *et al.*, 2006).

So konnten Richardson & Jasin (2000) in embryonalen Stammzellen von Maus durch I-SceI-Expression an definierten Loci auf den Chromosomen 14 und 17 zeigen, dass die Reparatur zweier simultan auftretender DSBs häufig zu reziproken Translokationen führt. In dieser Studie konnte die basale reziproke Translokations-Frequenz experimentalbedingt auf $< 10^{-7}$ eingeordnet werden, wogegen in einem Kontroll-Experiment (hier wurde bei ansonsten gleichen Bedingungen nur auf Chromosom 17 ein DSB induziert) bei einem DSB eine Translokations-Frequenz von 5×10^{-5} gefunden wurde, was einer mindestens 50-fachen Steigerung gegenüber spontan auftretenden Ereignissen entspricht. Bei gleichzeitiger Induktion von zwei DSBs wurde eine Frequenz von 4×10^{-4} gefunden. Dies ist mindestens 4000 mal höher als das spontane Auftreten solcher Ereignisse und etwa 80 mal effizienter als bei nur einem DSB. Daher konnte eindeutig ein synergistischer Effekt von zwei

simultanen DSBs gefunden werden (Richardson & Jasin, 2000). Mit Hilfe von FISH konnten die reziproken Translokationen auch visuell dargestellt werden.

Egli *et al.* (2004) zeigten durch I-SceI-induzierte DSBs in zwei verschiedenen P-Elementen in unterschiedlichen Loci im Genom von *Drosophila*, dass Translokationen in bis zu 1,8 % der Fälle auftraten. Maggert & Golic (2005) konnten ebenfalls in *Drosophila* durch Expression der Homing Endonuklease I-Crel aus *Chlamydomonas reinhardtii* reziproke Austausche zwischen X und Y Chromosomen induzieren. Die in dieser Arbeit beschriebene Austausch-Effizienz wird mit 5 % angegeben (Egli *et al.*, 2004).

Yu & Gabriel (2004) etablierten ein Assay-System zur Untersuchung reziproker Translokationen in Abwesenheit von Sequenz-Homologien in *S. cerevisiae*. Die DSB-Induktion auf zwei verschiedenen Chromosomen wurde mittels HO-Endonuklease erreicht. NHEJ-vermittelte reziproke Translokationen wurden bei einer von 30 überlebenden Zellen gefunden.

Elliott *et al.* (2005) fanden in mammalischen Zellen mittels I-SceI induzierten simultanen DSBs in Intron-Sequenzen nahe identischer *Alu*-Elemente, dass die meisten Brüche durch SSA repariert wurden (Frequenzen zwischen $3-5 \times 10^{-5}$). Bei divergierenden Sequenzen zwischen den *Alu*-Elementen wurde die DSB-Reparatur weitestgehend durch NHEJ katalysiert. Dies ist für die Stabilität des Humangenoms insofern relevant, als dass dieses zu 45 % aus repetitiven Sequenzen – davon 11 % *Alu*-Elementen (Lander *et al.*, 2001) – besteht. Daher existieren viele Möglichkeiten für Genomveränderungen, welche unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen können (Onno *et al.*, 1992; Strout *et al.*, 1998; Deininger & Batzer, 1999; Kolomietz *et al.*, 2002; Deininger *et al.*, 2003; Greaves & Wiemels, 2003; Hess, 2004).

Koshinsky *et al.* (2000) versuchten unter Verwendung des Cre-lox-System des Bakteriophagen P1 in fusionierten Protoplasten, Translokationen zwischen *Arabidopsis*- und Tabak-Chromosomen zu erzeugen. Diese Ereignisse konnten transient nachgewiesen werden.

4.1.6 Mögliche biotechnologische Anwendung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass es möglich ist, durch simultane Induktion zweier nicht gekoppelter DSBs reziproke Translokationen im Pflanzengenom herbeizuführen. Diese Methode kann mit Sicherheit in Zukunft auch biotechnologisch vielfältig genutzt werden.

Bei der Herstellung genetisch veränderter Pflanzen ist es die derzeit gängige Praxis, Selektionsmarkergene (Antibiotika- bzw. Herbizid-Resistenzen) zur Identifizierung transgener Individuen einzusetzen, welche meistens auf derselben T-DNA lokalisiert sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass reziproke Translokationen durch Induktion zweier ortsspezifischer DSBs sehr effizient in somatischen Pflanzenzellen induziert werden können (siehe Kapitel 4.1.4). Eine sich daraus ableitende biotechnologisch bedeutende Anwendung besteht in der gezielten Entkopplung von Selektions-Markergenen und dem zu exprimierenden „Wunschgen“ (engl. „*gene of interest*“, GOI). Anschließend könnten GOI und Markergene sehr leicht durch Auskreuzung separiert werden. Damit stellt diese Technik eine Alternative zur Markergen-Eliminierung durch *in vivo* Exzision dar (Siebert & Puchta, 2002).

Der gezielte Austausch von Chromosomenarmen birgt ein biotechnologisches Potenzial, welches weit über die Entkopplung von GOIs und Markergenen hinaus reicht. So könnten mit Hilfe der hier vorgestellten Technik Hybrid-Chromosomen wie von Koshinsky *et al.* (2000) beschrieben (siehe Kapitel 4.1.5) erzeugt werden. Solche Arbeiten wurden für fusionierte Zellen aus Ratte und Mensch bereits publiziert (Migeon & Miller, 1968; Weiss & Green, 1967). Hierdurch ist z.B. die klonale Vermehrung von Chromosomen bzw. Chromosomen-Teilen möglich. Viel bedeutender für die biotechnologische Anwendung ist jedoch die Erzeugung neuer Gen-Kombinationen mit Hilfe der vorgestellten Technik. Pionierarbeiten zur somatischen Hybridisierung von Pflanzenzellen wurden von Constabel (1976) beschrieben. Durch Protoplasten-Fusion zwischen den nahe verwandten Spezies *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* konnte gezeigt werden, dass Hybride entstehen, welche Teilgenome von beiden Eltern-Spezies enthalten (Gleba & Hoffmann, 1978; Forsberg *et al.*, 1994; Yamagishi *et al.*, 2002; für *Nicotiana*: Piastuch & Bates, 1990; für verschiedene *Brassica*-Spezies: Liu *et al.*, 2007; für Hybride aus *Nicotiana* und *Lycopersicon*: Wolters *et al.*, 1993; für Hybride aus *Brassica oleracea* and *Matthiola incana*: Sheng *et al.*, 2008; Übersichten in: Negrutiu *et al.*, 1992; Davey *et al.*, 2005; Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006). Die Fusion zwischen Protoplasten phylogenetisch nicht nahe verwandter Spezies führt in der Regel zu Hybriden mit einer asymmetrischen Genom-Kombination. Dabei gehen Teile des einen oder auch Teile von beiden Genomen auf nicht vorhersehbare Weise

verloren (Hinnisdaels *et al.*, 1988) und selten kommt es zu einer stabilen Integration eines Donor-Genoms in ein Rezipienten-Genom (Hinnisdaels *et al.*, 1991 & 1992). Diese seltenen Ereignisse lassen ebenfalls keine Vorhersage über die Zusammensetzung der entstehenden Genome zu. Für die moderne Züchtungsforschung sind jedoch vielmehr Methoden zur kontrollierten Modifikation von Genomen von Bedeutung.

Qin *et al.* (1994) konnten zeigen, dass es mit Hilfe des Cre-lox-System möglich ist, reziproke Austausch von Tabak-Chromosomen herbeizuführen. Das von ihnen beschriebene System hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass bei der Verwendung von ortsspezifischen Rekombinasen immer Erkennungssequenzen („Fingerabdrücke“) zurückbleiben. Folglich müssten für mehrfache Genom-Veränderungen verschiedene ortsspezifische Rekombinasen eingesetzt werden. Alternativ hierzu könnten in Zukunft sequenzoptimierte Meganukleasen oder Zinkfinger-Nukleasen zum Einsatz kommen.

So ist es vor Kurzem gelungen, durch die Verwendung von Zinkfinger-Nukleasen die Integration transgener Sequenzen an unterschiedlichen Stellen ins Pflanzen-Genom zu erreichen (Lloyd *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2005). Die Erkennungssequenz der Nuklease wird hierbei durch die entsprechenden DNA-bindenden "Zinkfinger" Domänen definiert. Diese Domänen können jeweils durch Vorexperimente für unterschiedliche Sequenzmotive konzipiert werden (Carroll *et al.*, 2006; Übersichten in: Durai *et al.*, 2005; Papworth *et al.*, 2005). So ist es im Prinzip möglich, an verschiedenen präderminierten Stellen im Genom Brüche zu erzeugen. Trotz Fortschritten auf diesem Gebiet besteht nach wie vor jedoch das Problem, dass diese Nukleasen auch unspezifisch im Genom schneiden, was neben Mutationen auch zu Letalität führen kann (Szczeppek *et al.*, 2007).

Als Alternative zu diesen sequenzspezifischen Zinkfinger-Nukleasen wird seit einigen Jahren ebenfalls intensiv und mit ersten Erfolgen an der Herstellung und Anwendung maßgeschneiderter sequenzspezifischer Meganukleasen gearbeitet, um ortsspezifische Rekombinations-Ereignisse zu induzieren (Bibikova *et al.*, 2003; Chames *et al.*, 2005; Chen & Zhao, 2005; Arnould *et al.*, 2006 & 2007; Smith *et al.*, 2006).

Durch eine Kombination der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Technik zum kontrollierten Austausch von Chromosomenarmen mit den oben diskutierten Techniken zur Induktion von ortsspezifischen DSBs ergeben sich völlig neue Möglichkeiten für die angewandte Züchtungsforschung. Die in dieser Arbeit vorgestellte Technik erlaubt es, Chromosomen-Teile eines Genoms oder aber auch Chromosomenstücke zwischen Genomen verschiedener Spezies spezifisch neu zu kombinieren. Hiermit könnten auch phylogenetische Barrieren überwunden werden, welche die Kombination von Genomen zwischen Spezies natürlicherweise verhindern. Die daraus resultierenden neuen Genkombinationen könnten im Gegensatz zur klassischen Züchtungsforschung sehr schnell und vor allem zielgerichtet erhalten und hinsichtlich verbesserter Eigenschaften untersucht werden. Damit birgt die hier vorgestellte Technik ein erhebliches biotechnologisches Potenzial.

4.2 Etablierung eines neuartigen Systems zur *in vivo* Quantifizierung von NHEJ-Ereignissen *in Arabidopsis*

Non-Homologous End-Joining ist in somatischen Pflanzenzellen der weitaus häufigste Mechanismus zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Dennoch wurde der Erforschung dieses Reparaturweges in Pflanzen lange Zeit nicht die entsprechende Bedeutung beigemessen. Dies ist partiell darauf zurück zu führen, dass die häufig anwendungsorientierte Grundlagenforschung seit geraumer Zeit versucht, eine Technik zur effizienten und ortsspezifischen Transgen-Integration basierend auf homologer Rekombination ins Pflanzengenom zu etablieren (Übersichten in: Reiss, 2003; Puchta, 2005).

So wurde erstmals *in planta* ein experimentelles System zur Analyse von genomischen NHEJ-Ereignissen von Salomon & Puchta (1998) etabliert (Kapitel 1.4.6). Mit diesem System konnten nach gezielter DSB-Induktion Tabak-Pflanzen regeneriert und Reparatur-Ereignisse sequenziert werden. Später wurde eine vergleichende Untersuchung der DSB-Reparatur durch SSA und NHEJ durch Siebert & Puchta (2002) publiziert. Mit dem in dieser Studie beschriebenen System ließen sich sowohl HR- als auch NHEJ-Ereignisse nachweisen (Kapitel 1.4.5). Während erstere relativ einfach histochemisch detektierbar waren, erfolgte die Analyse von NHR anhand zweier Parameter (Verlust des negativen Selektionsmarkers und keine Blaufärbung im histochemischen Test).

Bereits Gorbunova & Levy (1999) wiesen in ihrem Übersichtsartikel darauf hin, dass ein umfassendes Verständnis der DSB-Reparatur in somatischen Pflanzenzellen erst mit Systemen möglich ist, die eine quantitative Aussage über die Verwendung definierter Reparaturmechanismen unter präzise kontrollierbaren Variablen (Mutation in einem in die DSB-R involvierten Gen) erlauben.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, die bestehende Lücke zu füllen und ein solches System zur *in vivo* Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur durch NHEJ in *Arabidopsis* bereit zu stellen.

4.2.1 Ein neuer Ansatz zur Analyse der DSB-Reparatur *in planta*

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte experimentelle System basiert konzeptionell auf dem von Siebert & Puchta (2002) verwendeten Konstrukt (Kapitel 1.4.5 und 3.2.1). In der damaligen Studie wurde durch Expression der Meganuklease I-SceI ein negativer Selektionsmarker *in vivo* aus der in das Pflanzengenom integrierten T-DNA herausgeschnitten und Reparaturereignisse durch homologe Rekombination (SSA) konnten histochemisch nachgewiesen werden. Das in der vorliegenden Arbeit konstruierte System basiert ebenfalls auf der *in vivo* Exzision eines Teils der T-DNA durch I-SceI (Abbildung 3.8). Der entstehende DSB kann auf Grund fehlender Sequenzhomologien jedoch nur durch NHEJ repariert werden. Dadurch wird ein Promotor direkt mit dem Reporter gen verknüpft, was histochemisch nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses experimentelle System kloniert, in *Arabidopsis* eintransformiert und mit Hilfe von Segregations-Analysen hinsichtlich einer Integration an einem Locus charakterisiert. In der Folge wurden homozygote Linien etabliert und anhand einer äußerst stringenten Southern Blot-Analyse (Abbildungen 3.9 – 3.11) auf das Vorliegen einer vollständigen und funktionellen Einzelkopie des Transgenkonstruktes hin untersucht. Durch Bestimmung der Integrations-Loci der T-DNAs wurde die Voraussetzung für spätere PCR-basierte Genotypisierungen geschaffen (siehe Abbildung 2.4 und Tabelle 2.4).

Eine Validierung der erhaltenen Assay-Linien erfolgte durch Kreuzung mit einer konstitutiv die Meganuklease I-SceI exprimierenden *Arabidopsis*-Linie (Abbildung 3.13 und Tabelle 3.3). In allen fünf analysierten Linien konnte dabei eine signifikante Zunahme apparenter Rekombinations-Ereignisse gefunden werden. Bezogen auf die für jede Linie durchgeführte Kontroll-Kreuzung mit Wildtyp-Pflanzen

kann hierdurch ein Induktionsfaktor ermittelt werden. Die absoluten Werte zwischen den Experimenten variieren, so dass Schwankungen zwischen den Induktionsfaktoren gefunden wurden. Trotz aller Versuche, die experimentellen Bedingungen konstant zu halten, können z.B. Temperatur-Schwankungen während des Wachstums oder geringfügige Unterschiede bei der Oberflächensterilisation der Samen Ursachen für die in den drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gefundenen Variationen sein. Bei einem biologischen Messsystem wie diesem ist dies durchaus zu erwarten und stellt für künftige Analysen von DSB-Mutanten keinerlei Hindernis dar, da mit dem etablierten experimentellen System keine absoluten, sondern nur relative Veränderungen der Reparaturweg-Verwendung in Mutanten detektiert werden sollen (siehe Kapitel 4.2.4 und Abbildung 4.3).

Auch die inhärenten Eigenschaften des in dieser Arbeit etablierten Reporterkonstruktes können die Effizienz der Reparatur der I-SceI-induzierten DSBs beeinflussen. Durch *in vivo* Expression der Meganuklease I-SceI werden zwei DSBs induziert, wobei der Abstand zwischen den Bruchenden 1,8 kb beträgt.

Untersuchungen in *Drosophila* zeigen, dass bis zu 11 kb umfassende Lücken in solchen Fällen sehr effizient repariert werden, wogegen bei Abständen von 44 kb nur noch wenige und bei 210 kb keine Reparaturereignisse mehr detektiert werden konnten (Johnson-Schlitz *et al.*, 2006a). Ricchetti *et al.* (2003) fanden in *S. cerevisiae* bei simultanen DSBs in *cis* mit einem Abstand von 1,2 kb NHEJ-Frequenzen von $1-2 \times 10^{-2}$. Guirouilh-Barbat *et al.* (2004) wiesen in CHO-Zellen bei einer Distanz von 3 kb zwischen zwei in *cis* induzierten DSBs unabhängig von deren Sequenz NHEJ-Ereignisse mit einer Frequenz von 3×10^{-2} nach. Zarrin *et al.* (2007) konnten in von ES derivatisierten B-Zellen eine effiziente Reparatur von DSBs in hochrepetitiven Immunglobulin-Genregionen sogar in einem Abstand 100 kbp zueinander detektieren. Im Gegensatz dazu fanden Boubakour-Azzouz & Ricchetti (2008) in ES-Zellen von Maus, dass DSBs in einem Abstand von 9 kb nur mit geringer Effizienz repariert werden.

Die signifikante Zunahme apparenter Rekombinations-Ereignisse in dem neu etablierten NHEJ-Assay-System (Tabelle 3.3) weist darauf hin, dass Lücken zwischen DSBs mit einem Abstand von 1,8 kb in *Arabidopsis* effizient repariert werden können.

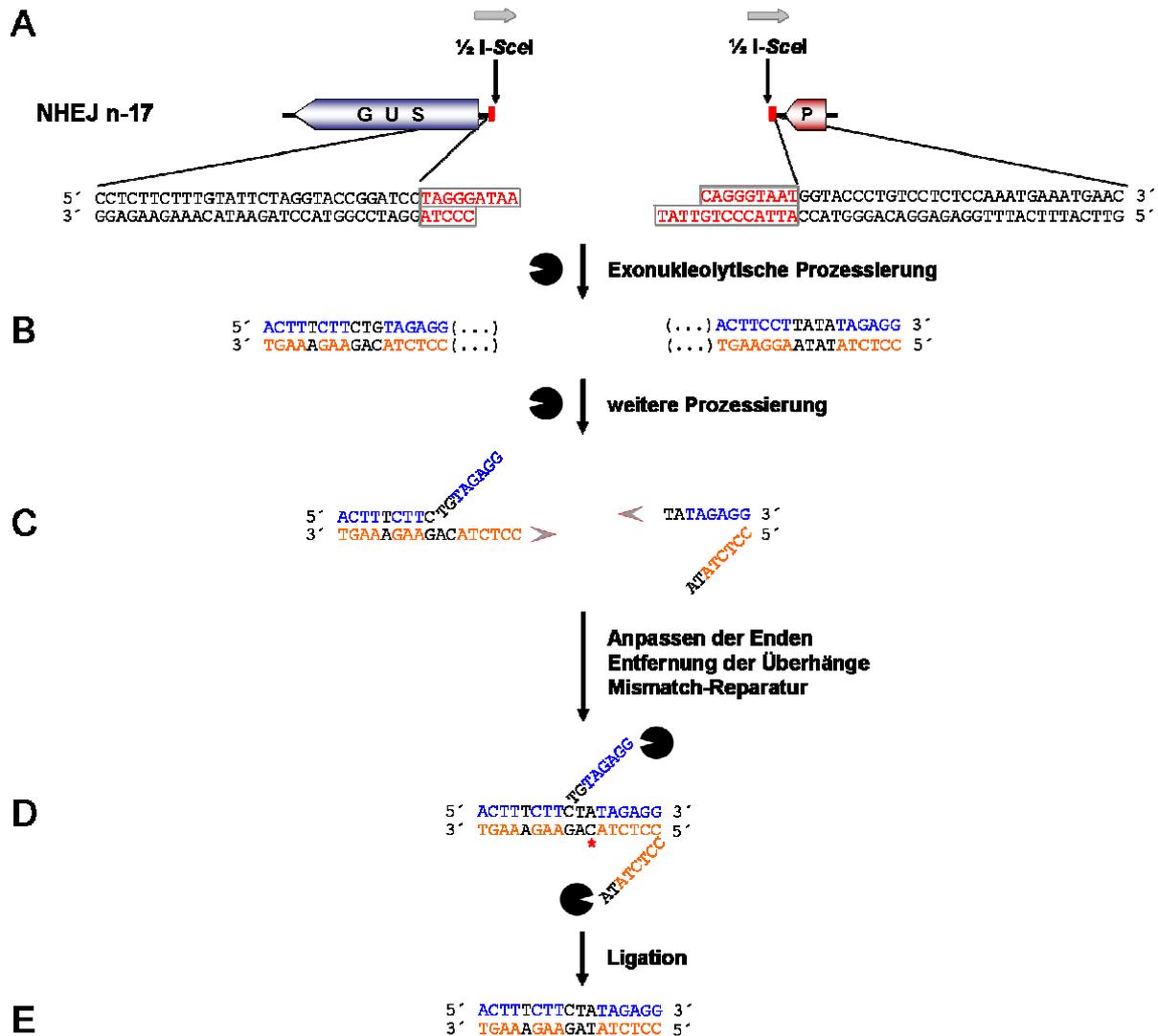


Abbildung 4.1: DSB-Reparatur durch einen SSA-ähnlichen Mechanismus. Dargestellt ist eine mechanistische Analyse des in Abbildung 3.14 gezeigten Rekombinations-Ereignisses A3. (A) Durch die katalytische Aktivität der Meganuklease I-SceI wurde *in vivo* aus der T-DNA der Rekombinations-Assay-Linie NHEJ n-17 ein lineares DNA-Fragment herausgeschnitten (nicht dargestellt, siehe Abbildung 3.8). Die Abbildung zeigt die Reparatur der beiden Bruchenden über einen SSA-ähnlichen Mechanismus (siehe Kapitel 1.4.5.3). Zunächst erfolgt eine exonukleolytische Prozessierung der Bruchenden über die geschnittene I-SceI-Erkennungssequenz hinaus. Das in (B) dargestellte Intermediat weist nicht-perfekte Sequenzhomologien in identischer Orientierung zueinander auf. Die identischen Nukleotide sind in blau (oberer Strang) und orange (unterer Strang) hervorgehoben. Durch eine weitere Prozessierung der Enden entstehen die in (C) gezeigten DSB-Enden. Über eine nicht perfekte Mikrohomologie von 8 Nukleotiden (ein Mismatch, markiert durch einen roten Stern) können die Enden durch einen SSA-ähnlichen Mechanismus aneinander angelagert werden (D). Die überstehenden Enden (Flaps) werden durch Nukleasen abgebaut und die Lücken ligiert (E). Durch die Aktivität der Mismatch-Reparatur-Maschinerie (siehe auch Kapitel 4.1.1) wird die Reparatur-bedingte Fehlpaarung beseitigt, wodurch die gezeigte Sequenz entsteht. Bei der DSB-Reparatur im dargestellten Fall gingen am 5'-Ende (GUS-seitig) 46 Nukleotide und 3'-Ende (Promotor-seitig) 37 Nukleotide verloren (siehe auch Abbildung 3.14).

Aus zwei der Kreuzungs-Populationen (NHEJ x I-SceI; siehe Kapitel 3.2.4 und Abbildung 3.14) wurden exemplarisch rekombinante Verknüpfungen zwischen den Bruchenden amplifiziert und sequenziert. Hierbei wurden die für NHEJ in Pflanzen typischen Sequenz-Modifikationen einschließlich „Filler“ DNA gefunden, welche auf die Aktivität eines SDSA-ähnlichen Mechanismus zurück zu führen sind (Gorbunova & Levy, 1997; siehe auch Kapitel 1.4.6 und Abbildung 1.9). In einem der sequenzierten Rekombinations-Ereignisse konnte durch Analyse der Sequenzen eindeutig ein SSA-ähnlicher Mechanismus für die DSB-Reparatur nachgewiesen werden (Abbildung 4.1). Während für die Linie NHEJ-n mit den kompatiblen I-SceI-Restriktionsfragmenten auch Ligations-Ereignisse gefunden wurden, konnten erwartungsgemäß für NHEJ-i ausschließlich Sequenz-Modifikationen gezeigt werden (Abbildung 3.14). Für spätere Mutanten-Analysen sind die Unterschiede zwischen den NHEJ-n und NHEJ-i Assay-Linien insofern relevant, als dass sehr wahrscheinlich verschiedene enzymatische Reaktionen zur Verknüpfung der unterschiedlichen Bruchenden erforderlich sind. So ist z.B. bei der DSB-Reparatur über den SSA-Mechanismus (siehe Kapitel 1.2) keine Strang-Invasion erforderlich und dieser Reparaturweg ist daher unabhängig von Faktoren, welche die Stranginvasion oder die Auflösung von Holliday Junctions vermitteln (Ivanov *et al.*, 1996; Übersicht in: Symington, 2002). Ma *et al.* (2003) konnten zudem zeigen, dass in *Saccharomyces cerevisiae* die DSB-Reparatur durch einen SSA-ähnlichen Mechanismus unabhängig von dem NHEJ-Schlüsselfaktor Ku ist, dafür jedoch die Aktivität von Mre11, Rad50 und Rad1 erfordert. Außer der Möglichkeit, zwischen den zur Reparatur von DSBs in diesen beiden verschiedenen transgenen Reportersubstraten erforderlichen Faktoren zu diskriminieren, sollte die NHEJ-n-Linie zusätzlich Auskunft über den quantitativen Beitrag von Ligations-Ereignissen bei kompatiblen Bruchenden liefern.

Insgesamt konnte eindeutig gezeigt werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit konzipierte System zur quantitativen Analyse der DSB-Reparatur durch NHEJ *in vivo* in *Arabidopsis* geeignet ist. Zusammen mit den von Orel *et al.* (2003) beschriebenen Assay-Linien zur quantitativen Analyse der HR durch SDSA und SSA (Kapitel 1.4.5) steht mit dem neu etablierten System nun erstmals ein die wichtigsten DSBR-Mechanismen abdeckendes Werkzeug zur umfassenden Analyse der Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen *in planta* zur Verfügung.

In den vergangenen Jahren wurde in anderen Organismen ebenfalls mit der umfassenden Analyse der DSB-Reparaturwege begonnen, um die Relevanz einzelner Faktoren besser verstehen und mit biochemischen und genetischen Daten in Einklang bringen zu können (in Maus ES-Zellen: Stark *et al.*, 2004; *Drosophila*: Johnson-Schlitz *et al.*, 2006 & 2007; Preston *et al.*, 2006a, b; Wei & Rong, 2007).

4.2.2 Ansätze zur Untersuchung der DSBR-Wege in anderen Organismen

Stark *et al.* (2004) untersuchten mit zwei verschiedenen Rekombinationssubstraten unter Verwendung von GFP als Reporter gen und I-SceI zur Erzeugung ortsspezifischer DSBs in ES-Zellen von Maus die Konsequenzen verschiedener Mutationen in Loci, welche DSBR-Gene kodieren. Diese Untersuchung war allerdings auf die Analyse von SSA und SDSA limitiert. Anhand der Ergebnisse konnten Stark *et al.* (2004) ein Modell entwickeln, welches einen Überblick über die Regulation der DSBR durch HR in mammalischen Zellen gibt.

Preston *et al.* (2006a) entwickelten ein System („Repair reporter 3, Rr3“), welches die vergleichende Analyse von NHEJ, SSA und Genkonversion durch SDSA in *Drosophila* erlaubt. Auch in diesem System wird ein ortsspezifischer DSB durch konstitutive Expression der Meganuklease I-SceI erzeugt. Abhängig von der Reparatur dieses Bruches kann ein funktionelles DsRed-Reporter gen restauriert werden, dessen Expression *in vivo* leicht zu detektieren ist. Mit Hilfe dieses Systems konnten Preston *et al.* (2006b) entwicklungsabhängige Unterschiede in der Verwendung der DSBR-Wege in *Drosophila* zeigen. Eine genaue Analyse der Daten zeigte, dass die relative Verwendung der Reparaturwege auf einer gegenseitigen Kompensation beruht. Diese negative Korrelation wird von Preston *et al.* (2006a, b) in Hinblick auf eine Konkurrenz der Reparaturwege um DSBs interpretiert.

Ebenfalls unter Verwendung von Rr3 konnten Johnson-Schlitz & Engels (2006b) in der prämeiotischen Keimbahn von *Drosophila*-Männchen zeigen, dass Mutanten des BLM-Gens defizient für die konservative HR sind. Dieser Defekt wird durch eine Steigerung des SSA-Mechanismus kompensiert. Zudem wurde eine Steigerung der Crossover-Häufigkeit um das 40 – 50-fache gefunden und auch die homologe Donor-Sequenz wurde durch Deletionen und Rearrangements verändert. Johnson-Schlitz & Engels (2006b) führen dies auf die fehlende Auflösung von Holliday-Junctions in *DmBlm*-Mutanten zurück und konnten denselben Effekt in

schwächerer Ausprägung in *DmTop3 α* -Mutanten finden. BLM und TOP3 α sind in die Auflösung von doppelten Holiday-Junctions involviert (Plank *et al.*, 2005).

Mit demselben System untersuchten Johnson-Schlitz *et al.* (2007) in *Drosophila* verschiedene Einzel- und Doppelmутanten in Loci, welche für in die DSBR involvierte Gene kodieren. Dabei wurde gefunden, dass die meisten Mutanten einen der DSBR-Wege unterdrückten und eine Kompensation durch Zunahme eines anderen Weges zu beobachten war. Keine der Einzelmутanten führte zur Unterdrückung von mehr als einem Reparaturweg. Sie unterschieden sich jedoch darin, wie die Unterdrückung kompensiert wurde. Basierend auf den Daten aus dieser Arbeit schlugen Johnson-Schlitz *et al.* (2007) vor, dass die Wahl des DSBR-Weges in einem Zwei-Schritte-Prozess abläuft, nach welchem ein DSB einem von zwei „Pools“ zuzuordnen ist. Aus diesen Pools können dann bestimmte Reparaturwege abhängig von den zur Verfügung stehenden bzw. um den Bruch konkurrierenden Faktoren beschränkt werden.

Wei & Rong (2007) verwendeten ebenfalls in *Drosophila* einen Reparatur-Assay, bei welchem die DSB-Induktion auch durch I-SceI hervorgerufen wird (Rong & Golic, 2003). Mit diesem System kann zwischen Genkonversion zwischen Schwesterchromatiden bzw. zwischen homologen Chromosomen, „perfektem“ NHEJ (Ligation), unpräzisem NHEJ und SSA unterschieden werden. Als Reportergen dient hierbei das ω -Gen, welches eine weiße Pigmentierung der Augenfarbe bei *Drosophila* hervorruft. Wei & Rong (2007) untersuchten *Drosophila*-Mutanten mit bekannten Reparaturdefizienzen und fanden ebenfalls eine komplex regulierte Balance zwischen verschiedenen Reparaturwegen, welche von der genomischen Umgebung des DSBs einerseits und dem zur Verfügung stehenden Komplement an DSBR-Faktoren abhängt.

4.2.3 DSB-Reparatur durch NHEJ in *Arabidopsis thaliana*

Das Wissen um die an der DSB-Reparatur durch NHEJ beteiligten Proteine basiert bislang zu großen Teilen auf der Analyse von Hefemutanten, welche hypersensitiv gegen ionisierende Strahlung oder genotoxische Chemikalien sind. Weitere Erkenntnisse wurden zudem durch Untersuchungen an Säugerzellen und an *Drosophila* gewonnen. Die Entwicklung neuer Methoden zur Untersuchung genetischer als auch genomischer Fragestellungen ergibt inzwischen einen recht

umfassenden Einblick in den enzymatischen Ablauf der DSB-Reparatur durch NHEJ (Abbildung 4.2; Wu *et al.*, 2008; Übersichten in: Pâques & Haber, 1999; Shrivastav *et al.*, 2008).

Die vollständige Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) sowie die Möglichkeiten der reversen Genetik haben in den letzten Jahren zur Beschreibung zahlreicher Gene geführt, die bei diesem Modell-Organismus in die Reparatur von DSBs durch NHEJ involviert sind (Übersichten in: Hays, 2002; Bleuyard *et al.*, 2006). So konnten in *Arabidopsis* durch die Charakterisierung verschiedener T-DNA-Insertions- und Transposon-Integrations-Mutanten verschiedene Homologe bzw. Paraloge zu Genen identifiziert werden, welche in die DSBR durch NHEJ involviert sind (Tabelle 4.1).

Die bisher publizierten Daten zeigen, dass an nicht-kompatible Enden in Säugerzellen zunächst der MRE11/RAD50/NBS1 (MRN)-Komplex (in Hefe: MRX, Trujillo & Sung, 2001) und möglicherweise noch weitere Faktoren an den DSB rekrutiert werden (Shrivastav *et al.*, 2008). Der MRN-Komplex leitet demnach eine limitierte exonukleolytische Prozessierung ein. Zudem wurde eine Stimulation der Ligase-Aktivität des XRCC4/LigaseIV-Komplexes beschrieben (Huang & Dynan, 2002; Udayakumar *et al.*, 2003). Homologe zu allen drei Komponenten des MRN-Komplexes wurden für *Arabidopsis* identifiziert. Untersuchungen an Mutanten dieser Gene zeigen zudem, dass diese in die DNA-Reparatur involviert sind. So wurden für *atmre11*-Mutanten schwere Defekte in der Entwicklung und eine Hypersensitivität gegenüber Genotoxinen beschrieben (Bundock & Hooykaas, 2002). Puizina *et al.* (2004) wiesen eine generelle Chromosomen-Instabilität in somatischen Zellen in *atmre11*-Mutanten nach. Gallego *et al.* (2001) fanden für Mutanten des AtRAD50-Gens eine Sensitivität gegenüber MMS und eine vollständige Sterilität. Für *atrad50*-Mutanten wurde eine Steigerung der HR beschrieben (Gherbi *et al.*, 2001), wie dies auch in *yrad50*-Mutanten gefunden wird (Malone *et al.*, 1990). Daoudal-Cotterell *et al.* (2002) konnten durch Co-Immuno-Präzipitation eine direkte Interaktion von AtRAD50 mit AtMRE11 nachweisen und damit zeigen, dass die funktionelle Assoziation dieser beiden Faktoren auch in Pflanzen konserviert ist. Da sowohl *atrad50* als auch *atmre11* homozygot steril sind, wird eine Beteiligung des MRN-Komplexes *in planta* an der meiotischen HR angenommen, was sich mit den für Hefen und Säugern publizierten Daten deckt (Übersicht in: Shrivastav *et al.*, 2008).

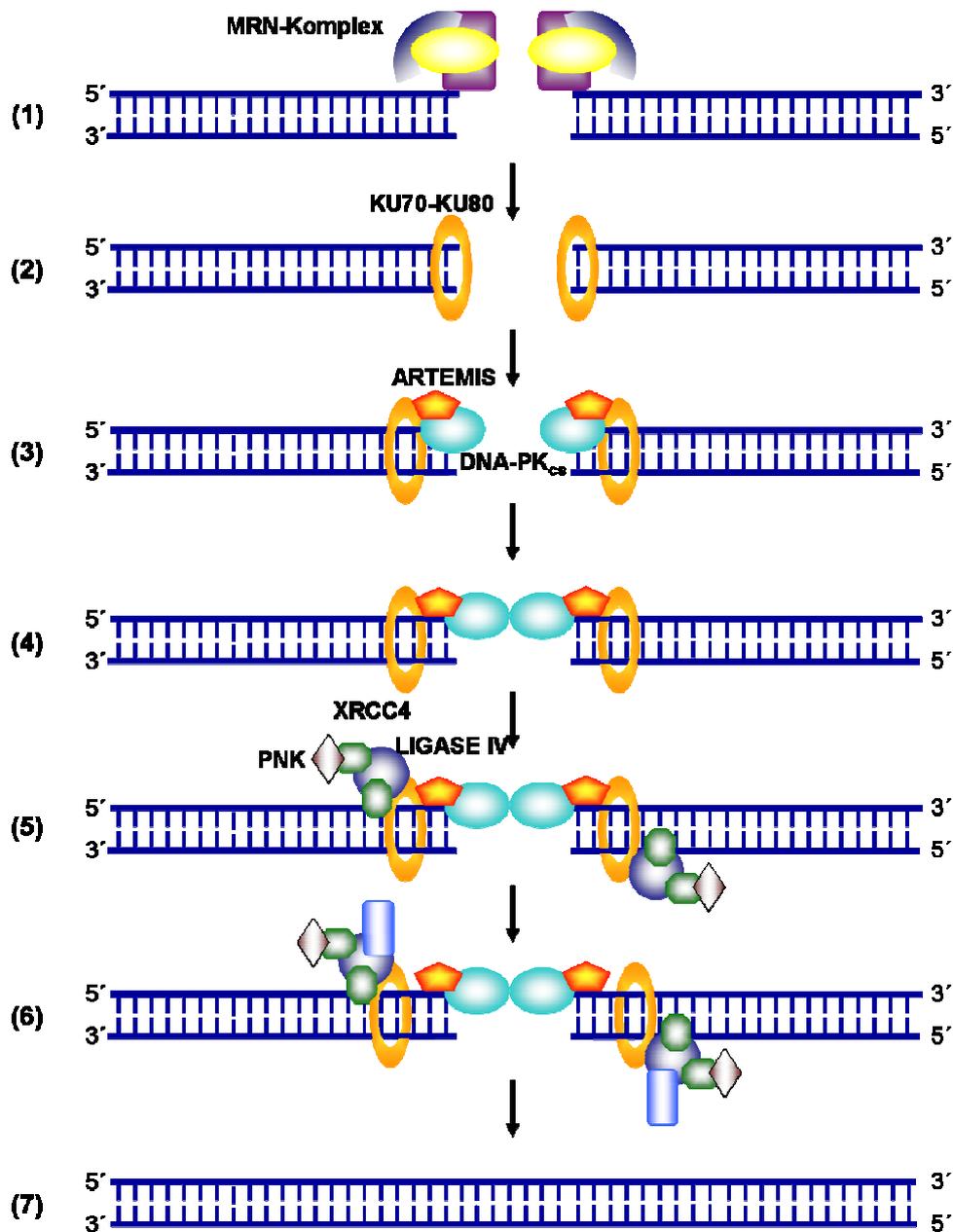


Abbildung 4.2: Enzymatischer Ablauf des NHEJ. Abhängig von der Struktur der DSB-Enden (1) wird der MRN-Komplex rekrutiert, welcher eine limitierte Prozessierung der Enden zur Exposition von Sequenzhomologien zur Folge hat. (2) Das KU70-KU80-Heterodimer wird von den Telomeren an den Bruch rekrutiert und bindet sequenzunabhängig. (3) Durch Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) entsteht das DNA-PK-Holoenzym, welches zusammen mit ARTEMIS die Enden des Bruches weiter prozessiert. (4) Anschließend wird der XRCC4/LIGASE IV-Komplex sowie die Polynukleotid-Kinase (PNK) rekrutiert. Die PNK kann ggf. an 5'-Strangenden Phosphat-Gruppen anhängen. Durch die Aktivität von XRCC4/LIGASE IV werden die Enden miteinander verknüpft. Alternativ zu dem hier vorgestellten „klassischen NHEJ-Weg“ beschrieben Audebert *et al.*, (2004) in Säugerzellen einen weiteren Weg der NHR, welcher von PARP-1 und XRCC1/LigaseIII abhängig ist.

Tabelle 4.1: Die zentralen Proteine des NHEJ von Hefe, Vertebraten und *Arabidopsis*. Die angegebene Literatur bezieht sich auf Arbeiten zu den *Arabidopsis*-Proteinen.

<i>S. cerevisiae</i>	Vertebraten	<i>Arabidopsis</i>	Funktion	Literatur
Mre11	MRE11	MRE11	Prozessierung von DSB-Enden	Bundock <i>et al.</i> , 2002; Puizina <i>et al.</i> , 2004
Rad50	RAD50	RAD50	Prozessierung von DSB-Enden	Gallego <i>et al.</i> , 2001; Gherbi <i>et al.</i> , 2001; Daoudal-Cotterell <i>et al.</i> , 2002
Xrs2	NBS1	NBS1	Prozessierung von DSB-Enden	Akutsu <i>et al.</i> , 2007
Hdf1	KU70	KU70	DNA-Bindung, Rekrutierung anderer Proteine	Tamura <i>et al.</i> , 2003
Hdf2	KU89 (KU86)	KU80	DNA-Bindung, Rekrutierung anderer Proteine	West <i>et al.</i> , 2002; Tamura <i>et al.</i> , 2003; Gallego <i>et al.</i> , 2003
—	DNA-PK _{cs}	—		
Dnl4	ARTEMIS	Snm3?		Molinier <i>et al.</i> , 2004
Lif1	Ligase IV	LIG4	Ligation	van Attikum <i>et al.</i> , 2003
Nej1	XRCC4	XRCC4	Prozessierung der Enden	West <i>et al.</i> , 2002
Nej1	—	—	Rekrutierung von Dnl4	

Akutsu *et al.* (2007) beschrieben Homologe des NBS1-Proteins in *Arabidopsis* und Reis und zeigten eine Beteiligung dieser Proteine an der DNA-Reparatur. Damit konnten Gegenstücke zu allen drei im MRN-Komplex auftretenden Faktoren *in planta* nachgewiesen und ihre Beteiligung an der DSB-Reparatur nachgewiesen werden.

Nach der limitierten Prozessierung der Bruchenden werden diese in der Folge Struktur- und sequenzunabhängig durch den KU-Komplex (bestehend aus den Untereinheiten KU70 und KU80) gebunden (Boulton & Jackson, 1998a, b), welcher in Säugerzellen die katalytische Untereinheit der Proteinkinase (DNA-PK_{cs}) rekrutiert.

Der KU70/KU80-Komplex ist normalerweise an den Chromosomen-Enden lokalisiert und trägt zum Schutz der Telomere bei (Gravel *et al.*, 1998; Übersicht in: Riha *et al.*, 2006). Beim Auftreten eines DSB kommt es zur schnellen Translokation des KU-Komplexes an den Bruch (Martin, 1999; Rivera-Calzada *et al.*, 2007). In der Literatur wird beschrieben, dass das KU-Heterodimer eine Rolle bei der Positionierung der DNA-Enden in räumlicher Nähe zueinander spielt (Pang *et al.*, 1997; Feldmann *et al.*, 2000; Downs & Jackson, 2004) und zudem weitere Faktoren für die Prozessierung rekrutiert (Nick McElhinny *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2001). Eine vergleichbare Funktion wurde auch für die DNA-abhängige Protein-Kinase (DNA-PK) aus Mensch vorgeschlagen (Yaneva *et al.*, 1997), welche allerdings weder in Hefe noch in Pflanzen gefunden wurde. KU70-80 bilden in Säugerzellen zusammen mit DNA-PK_{cs} das heterotrimere DNA-PK-Holoenzym. Nach Bindung an die DSB-Enden erfolgt eine Aktivierung der DNA-PK durch Autophosphorylierung (Burma & Chen, 2004; Collis *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2005). Weitere Zielproteine wie RPA (Shao *et al.*, 1999), WRN (Yannone *et al.*, 2001; Karmakar *et al.*, 2002) und ARTEMIS werden

ebenfalls phosphoryliert. Die Funktion von ARTEMIS besteht hierbei in der Reifung der DSB-Enden (Ma *et al.*, 2002 & 2005).

Zur Verknüpfung nicht komplementärer Enden ist die Synthese kurzer DNA-Stücke erforderlich. In Hefe wird diese Reaktion von POL4 (Wilson & Lieber, 1999) und in höheren Eukaryoten von POL μ und POL λ katalysiert (Pitcher *et al.*, 2007a) katalysiert. Ebenfalls von Bedeutung für die DSB-Reparatur durch NHEJ ist die Terminale Nukleotid Transferase (TNT). Diese kann unabhängig von einer Matrize Nukleotide an freie Enden oder 3'-Überhänge knüpfen, wodurch eine Bindung an das andere DSB-Ende ermöglicht wird (Nick McElhinny *et al.*, 2005).

Nach der Prozessierung der Enden werden diese durch den DNA-LigaseIV/XRCC4/XLF Komplex ligiert (Chen *et al.*, 2000; West *et al.*, 2000; Martin & MacNeill, 2002; Hefferin & Tomkinson, 2005; Gu *et al.*, 2007). Diese Aufgabe übernimmt in *Saccharomyces cerevisiae* der DNL4/LIF1-Komplex (Schär *et al.*, 1997; Teo & Jackson, 1997; Ramos *et al.*, 1998; Grawunder *et al.*, 1997).

In *Arabidopsis* wurden Homologe der Proteine KU70, KU80 und LigaseIV beschrieben. Ein putatives Ortholog zu ARTEMIS wurde ebenfalls gefunden, jedoch liegen hierzu bislang keine Daten von Mutantanalysen vor (Molinier *et al.*, 2004). Bei Analysen der Mutanten *atku70*, *atku80* und *atlig4* wurde generell eine Sensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien beschrieben, was auf eine Beteiligung dieser Faktoren an der DNA-Reparatur hinweist (Tamura *et al.*, 2002; West *et al.* 2002, Friesner & Britt, 2003; Gallego *et al.*, 2003; van Attikum *et al.*, 2003). Eine Interaktion zwischen AtLIG4 und AtXRCC4 konnte von West *et al.* (2000) nachgewiesen werden.

Interessanterweise wachsen die Mutanten *atku70*, *atku80* und *atlig4* unter Standard-Bedingungen phänotypisch unauffällig, wogegen KU70 und KU80 defiziente Mäuse ein retardiertes Wachstum zeigen (Nussenzweig *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997). Eine Defizienz für LigaseIV ist bei Mäusen bereits embryonal lethal (Barnes *et al.*, 1998).

Ebenfalls eine Rolle beim NHEJ spielt BRCA1 möglicherweise durch Regulation der Exonuklease-Aktivität von MRE11 (Zhong *et al.*, 2002; Durant & Nickoloff, 2005). Zudem wird ein alternativer XRCC1/LigaselIII-vermittelter NHEJ-Weg beschrieben, der durch die Aktivität von PARP-1 gefördert wird und fehleranfälliger als der klassische Weg ist (Audebert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006).

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass der klassische KU-abhängige DSB-Reparaturweg durch NHEJ in *Arabidopsis* konserviert ist (Bleuyard *et al.*, 2006). Arbeiten von Gallego *et al.* (2003) zeigen jedoch auch, dass in KU-defizienten *Arabidopsis*-Mutanten NHEJ weniger effizient abläuft, allerdings nach wie vor von Bedeutung für die DSB-Reparatur ist. Sehr wahrscheinlich existieren auch in Pflanzen alternative Wege zur Beseitigung von DSBs durch NHEJ. Diese vermutliche Redundanz überrascht insofern nicht, als das NHEJ der bedeutendste Reparatur-Mechanismus für DSBs in somatischen Zellen von Pflanzen ist.

Die auffälligen Unterschiede zwischen *Arabidopsis* und Maus in Bezug auf Defizienzen in KU70/80 bzw. LigaselIV weisen jedoch daraufhin, dass trotz der offensichtlichen Konservierung dieser Proteine und Reparaturwege im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt wurden, die Pflanzen eine größere Flexibilität im Umgang mit DNA-Schäden erlauben.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte experimentelle System zur *in vivo* Quantifizierung von NHEJ wird mit Sicherheit in Zukunft einen wichtigen Beitrag dazu leisten, die komplexen Zusammenhänge und Interaktionen der DSB-Reparatur-mechanismen in somatischen Pflanzenzellen aufzuklären.

4.2.4 Ausblick: zukünftige Anwendung des neuen Systems in *Arabidopsis*

Verschiedene genomische Ansätze geben Hinweise auf bisher unentdeckte Faktoren, welche in die DSB-Reparatur involviert sind (Chen *et al.*, 2003). Außerdem liefern biochemische Analysen Daten über einzelne an diesen Mechanismen beteiligte Faktoren (Plchova *et al.*, 2003) und Interaktionsstudien erlauben Einblicke in das Zusammenwirken verschiedener Proteine (Daoudal-Cotterell *et al.*, 2002). Ansätze der reversen Genetik ermöglichen zudem die Analyse von Mutanten hinsichtlich veränderter Rekombinations-Frequenzen (Hartung *et al.*, 2006 & 2007; Reidt *et al.*, 2006).

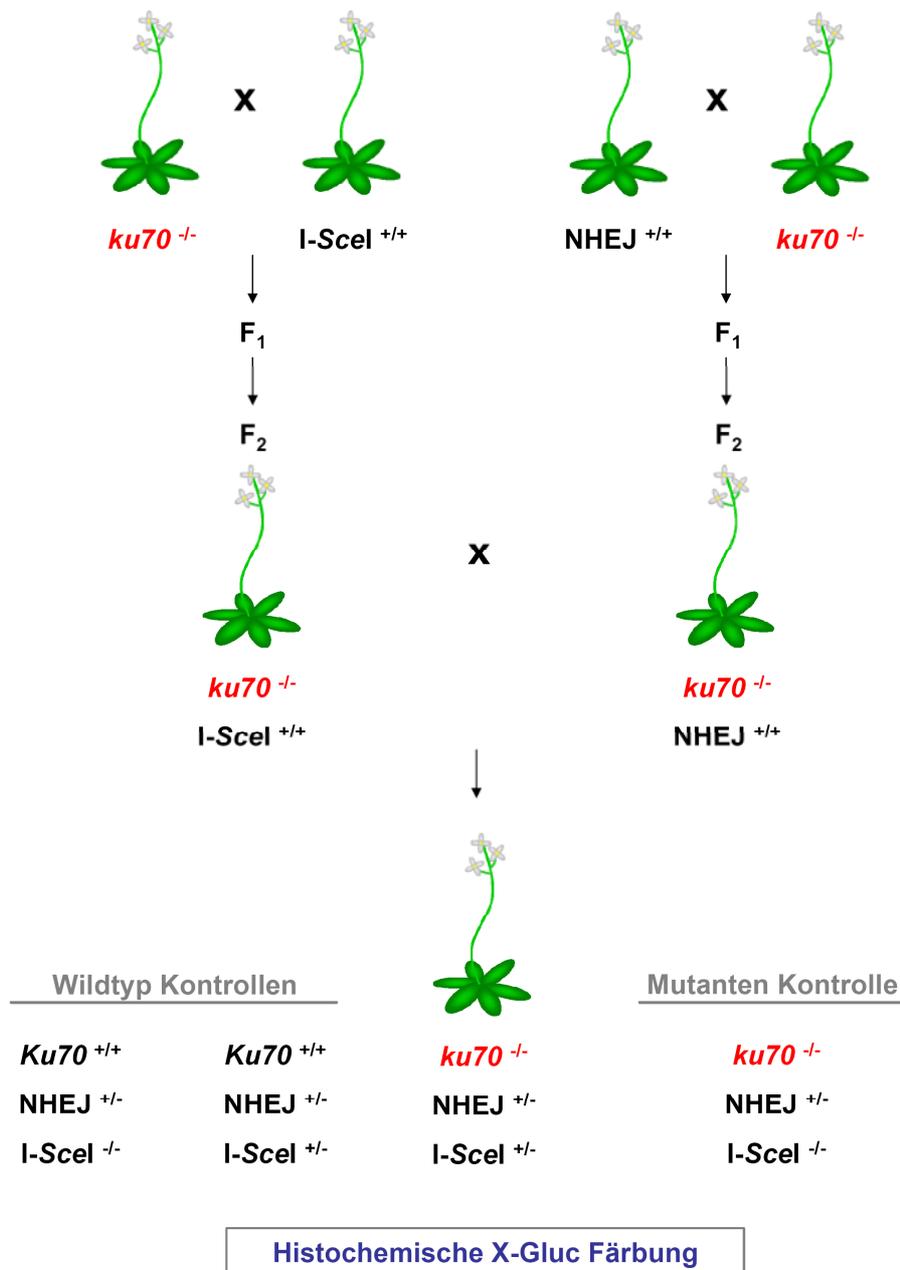


Abbildung 4.3: Analyse von DSBR-Mutanten mit Hilfe des neu etablierten NHEJ-Assay-Systems. Gezeigt ist das allgemeine Schema der erforderlichen Kreuzungen zur Mutanten-Analyse am Beispiel des NHEJ-Schlüsselfaktors KU70. Hierzu muss die zu untersuchende Mutante (z.B. *ku70*) sowohl mit einer homozygoten *I-SceI*-Expressionslinie als auch mit einer homozygoten *NHEJ*-Linie gekreuzt werden. Deren Nachkommen sind hemizygot für die parentalen T-DNAs und werden daher durch Selbstung vermehrt. In der F_2 -Generation können durch ein PCR-basiertes Screening die interessierenden Genotypen identifiziert und für die folgende Kreuzung verwendet werden. Hierbei sind neben der Experimentalkreuzung bestimmte Genotypen für Kontroll-Kreuzungen erforderlich (nicht gezeigt). Dabei entstehen in der F_3 -Generation diejenigen Genotypen, bei denen nach einer histochemischen Färbung eine Quantifizierung apparenter Rekombinations-Ereignisse eine Aussage über die Beteiligung des in der Mutante fehlenden Proteins am NHEJ erlaubt. Die dargestellten Kontrollen ermöglichen auch eine Aussage über das Grund-Niveau NHEJ-vermittelter Rekombinations-Ereignisse im Mutanten-Hintergrund. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Schema nicht für homozygot-sterile Mutanten (z.B.: *atmre11*) dargestellt. Das Assay-System kann aber auch zu deren Analyse verwendet werden.

Ein Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen und Interaktionen hinsichtlich der Verwendung der Reparaturwege erfordert zudem eine quantitative *in vivo* Analyse der unterschiedlichen DSBR-Wege. Die im vorigen Kapitel diskutierten Arbeiten zur Analyse dieser Reparaturmechanismen in *Drosophila* und Maus zeigen, dass ein umfassendes Verständnis der DSB-Reparaturwege die Erarbeitung neuer integrativer Modelle erlaubt, mit welchen Vorhersagen über Mechanismen in bestimmten Mutanten oder Doppelmutanten getroffen werden können (Johnson-Schlitz *et al.*, 2007). Dies ist insbesondere für die anwendungsorientierte Grundlagenforschung relevant, die – wie oben diskutiert – Wege zur effizienteren Transgen-Integration an prädeterminierte Loci *in planta* sucht.

Zusammen mit den von Orel *et al.* (2003) vorgestellten Systemen zur Analyse von SSA und HR in *Arabidopsis* ermöglicht das im Rahmen der vorliegenden Dissertation etablierte und charakterisierte NHEJ-Assay-System in Zukunft eine umfassende Analyse der DSB-Reparatur *in planta*. Hierzu wird es notwendig sein, sowohl die I-SceI-Expressionslinie als auch eine Rekombinations-Assay-Linie mit *Arabidopsis*-Mutanten zu kreuzen. In den resultierenden F₂-Generationen werden verschiedene Genotypen erhalten, die unter anderem auch als interne Kontrollen dienen und denselben Anzuchtbedingungen unterliegen (Abbildung 4.3). Durch Kreuzen der I-SceI-Expressionslinie im homozygoten Mutantenhintergrund mit einer Rekombinationslinie im homozygoten Mutantenhintergrund können in der folgenden Generation durch histochemische Färbung quantitative Unterschiede eines Weges der DSB-Reparatur abhängig vom verwendeten Rekombinationssubstrat einfach erfasst werden (Abbildung 4.3). Ein Vergleich der Induktionsfaktoren zwischen Mutanten- und Wildtyp-Hintergrund sollte demnach direkt die Konsequenz des Fehlens eines definierten Faktors darstellen.

Werden solche Analysen für zahlreiche DSBR-Faktoren unter Verwendung von Rekombinations-Assay-Linien für verschiedene DSBR-Wege durchgeführt, sollte sich vergleichbar mit den von Stark *et al.* (2004) in Maus bzw. von Johnson-Schlitz *et al.* (2007) in *Drosophila* erarbeiteten Modellen auch für *Arabidopsis* ein übersichtliches Schema der DSBR-Wege erstellen lassen und biochemische sowie genetische Daten ergänzen und Vorhersagen über die Konsequenzen von Inhibition oder Überexpression einzelner oder mehrerer Faktoren erlauben. Letztere könnten

den Bestrebungen der Grünen Biotechnologie hinsichtlich der Entwicklung von Strategien zur effizienten und ortsspezifischen Transgen-Integration zu Gute kommen.

5 Zusammenfassung

Doppelstrangbrüche stellen die gefährlichsten Beschädigungen der Erbinformation dar und müssen repariert werden, da nur intakte Genome vollständig repliziert werden können. Je nach Art der Reparaturmechanismen (homologe Rekombination oder Non-homologous End-Joining) wird die Sequenz-Information restauriert oder verändert. Da Pflanzen keine prädeterminierte Keimbahn besitzen, können Mutationen in somatischen Zellen an Nachkommen weitergegeben und dadurch im Genom fixiert werden. Die Reparatur von DSBs dient damit einerseits der Wahrung der genomischen Stabilität, die verschiedenen Wege ihrer Ausführung erhöhen auf der anderen Seite die Plastizität des Genoms und bieten Pflanzen damit eine einzigartige Möglichkeit, durch somatische Genom-Evolution das Adaptations-Potenzial an sich ändernde Umweltbedingungen zu erhöhen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines neu entwickelten experimentellen Systems erstmals für Pflanzen untersucht, wie zwei simultan auftretende nicht-gekoppelte Doppelstrangbrüche in somatischen Zellen von Tabak repariert werden. Die Konzeption des experimentellen Systems ermöglichte hierbei die Selektion von Translokationsereignissen unabhängig von dem zu Grunde liegenden Reparaturmechanismus. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei zwei gleichzeitig auftretenden DSBs in etwa einem Prozent der Fälle die verkehrten Enden miteinander gekoppelt werden können. Damit finden reziproke Translokationen um zwei Größenordnungen häufiger statt als Genkonversionen durch ektopische HR. Dies zeigt, dass die Entstehung neuer genetischer Kopplungen auf somatischer Ebene eine bedeutende Triebkraft der Genom-Evolution darstellt.

Molekulargenetische Analysen der rekombinanten Kopplungen zeigten zudem, dass zwei simultan in einem Genom auftretende DSBs sowohl durch HR als auch durch NHEJ repariert werden können. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die rekombinanten Kopplungen stabil über die Keimbahn an Nachkommen weitergegeben werden und normal segregieren. Damit ist das vorgestellte experimentelle System auch für biotechnologische Anwendungen von immenser Bedeutung: durch ortsspezifische Induktion zweier simultaner DSBs können gezielt Chromosomenarme ausgetauscht werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation war es, ein experimentelles System in *Arabidopsis* zu etablieren, welches erstmals eine *in vivo* Quantifizierung von NHEJ-Ereignissen ermöglicht. Nach der Etablierung homozygoter Reporterlinien wurden diese molekulargenetisch auf das Vorhandensein eines einzigen und vollständigen sowie funktionsfähig integrierten Reporterkonstruktes untersucht. Die erfolgreiche Bestimmung der Insertions-Loci der Rekombinationssubstrate in den fünf dadurch erhaltenen Reporterlinien ermöglicht eine für die spätere Anwendung des experimentellen Systems essentielle PCR-basierte Genotypisierung. Durch Expression der Meganuklease I-SceI wurden *in vivo* DSBs in den Reporterkonstrukten der transgenen Linien erzeugt und ihre Reparatur durch NHEJ quantitativ erfasst. Hierbei konnte für alle fünf Linien eine signifikante Zunahme apparenter Rekombinations-Ereignisse nach I-SceI-Expression nachgewiesen werden. Anhand einer Analyse von Rekombinations-Ereignissen wurden für NHEJ *in planta* charakteristische Eigenschaften, wie die Insertion von "Filler"-Sequenzen aus anderen genomischen Loci in den Bruch, nachvollzogen.

6 Summary

Double-strand breaks are the most severe lesions in genomes and their repair is crucial for the survival of all organisms. These breaks have to be repaired as only intact genomes can undergo replication. Depending on the mechanism of repair (homologous recombination or non-homologous end-joining) the sequence information is restored or mutations can arise. As plants do not have a predetermined germline mutations can be fixed in somatic genomes and can thereby be transmitted to the offspring. The repair of DSBs is therefore essential for the conservation of the genome stability on the one hand but on the other different ways of DSB repair offer an additional possibility to enhance the genetic plasticity which can increase the adaptation capacity to changing environmental conditions by somatic genome evolution.

In course of this thesis for the first time a new experimental system was used to analyze in plants the outcome of two simultaneous double-strand breaks in *trans*. The set-up of the assay system allowed for selection of translocation events independently of the underlying repair mechanism. The results of this work clearly show that in case of two simultaneous DSBs in unlinked positions in up to one percent of the cases the wrong ends can be joined. Therefore reciprocal translocations are up to two orders of magnitude more efficient than ectopic gene conversion by homologous recombination. Consequently, the occurrence of new genetic linkages in somatic tissue is an important driving force in genome evolution.

By molecular genetic analysis of recombinant junctions it was shown that two simultaneous DSBs can be repaired both *via* HR and by NHEJ at the same time. Further it was demonstrated that both recombinant junctions are transmitted *via* the germline and display a normal segregation pattern. Therefore the experimental system used in this thesis is also of fundamental importance for biotechnological applications as the controlled exchange of chromosome arms by site-specific induction of two simultaneous DSBs can be triggered.

A further aim of this study was to establish an experimental system in *Arabidopsis* which for the first time would allow an *in vivo* quantification of NHEJ mediated DSB repair events. After establishing homozygous reporter lines these were analyzed by molecular genetic tools for a complete and functional single copy

insertion of the respective reporter construct. The insertion loci of the recombination substrates were determined successfully for all five assay lines allowing PCR based genotyping which is a premise for the envisaged utilization of the system later on. By expression of the meganuclease I-SceI DSBs were introduced in the transgenic reporter lines *in vivo* and the subsequent repair through NHEJ was quantified. A significant increase of apparent recombination events after I-SceI expression could be demonstrated. Sequence analysis of recombination events allowed retracing characteristics of plant NHEJ like insertion of filler DNA from other genomic loci into the break site.

7 Literatur

- Akutsu N, Iijima K, Hinata T und Tauchi H** (2007). Characterization of the plant homolog of Nijmegen breakage syndrome 1: Involvement in DNA repair and recombination. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **353**: 394–398
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815
- Arnould S, Chames P, Perez C, Lacroix E, Duclert A, Epinat JC, Stricher F, Petit AS, Patin A, Guillier S, Rolland S, Prieto J, Blanco F, Bravo J, Montoya G, Serrano L, Duchateau P und Pâques F** (2006). Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *J. Mol. Biol.* **355**: 443–458
- Arnould S, Perez C, Cabaniols JP, Smith J, Gouble A, Grizot S, Epinat JC, Duclert A, Duchateau P und Pâques F** (2007). Engineered I-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **371**: 49–65
- Athma P und Peterson T** (1991). *Ac* induces homologous recombination at the maize *P* locus. *Genetics* **128**: 163–173
- 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. *J. Biol. Chem.* **279**: 55117–55126
- Aylon Y und Kupiec M** (2003). The checkpoint protein Rad24 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in processing double-strand break ends and in recombination partner choice. *Mol. Cell Biol.* **23**: 6585–6596
- Aylon Y und Kupiec M** (2004). DSB repair: the yeast paradigm. *DNA Repair (Amst)* **23**: 797–815
- Aylon Y, Liefshitz B und Kupiec M** (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J.* **23**: 4868–4875
- Bakkeren G, Koukolikova-Nicola Z, Grimsley N und Hohn B** (1989). Recovery of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA molecules from whole plants early after transfer. *Cell* **57**: 847–857
- Baran G, Echt C, Bureau T und Wessler S** (1992). Molecular analysis of the maize *wx-B3* allele indicates that precise excision of the transposable element *Ac* is rare. *Genetics* **130**: 377–384
- Barnes DE, Stamp G, Rosewell I, Denzel A und Lindahl T** (1998). Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr. Biol.* **8**: 1395–1398
- Baur M, Potrykus I und Paszkowski J** (1990). Intermolecular homologous recombination in plants. *Mol. Cell Biol.* **10**: 492–500
- Belmaaza A und Chartrand P** (1994). One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mut. Res.* **314**: 199–208
- Bennett CB, Lewis AL, Baldwin KK und Resnick MA** (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5613–5617
- Bennett CB, Westmoreland TJ, Snipe JR und Resnick MA** (1996). A double-strand break within a yeast artificial chromosome (YAC) containing human DNA can result in YAC loss, deletion or cell lethality. *Mol. Cell Biol.* **16**: 4414–4425

- Bennett MD und Leitch IJ.** (1997). Nuclear DNA amounts in angiosperms—583 new estimates. *Ann. Bot.* **80**: 169–196
- Bennetzen JL und Kellog EA** (1997). Do plants have a one-way ticket to the genomic obesity? *Plant Cell* **9**: 1509–1514
- Bibikova M, Beumer K, Trautman JK und Carroll D** (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* **300**: 764
- Bilang R, Peterhans A, Bogucki A und Paszkowski J** (1992). Single-stranded DNA as recombination substrate in plants assessed by stable and transient expression. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 329–336
- Blanc G, Barakat A, Guyot R, Cooke R und Delseny M** (2000). Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell* **12**: 1093–1101
- Bleuyard J-Y, Gallego ME und White CI** (2006). Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA Repair (Amst)* **5**: 1–12
- Boubakour-Azzouz I und Ricchetti M** (2008). Low joining efficiency and non-conservative repair of two distant double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *DNA Repair (Amst)* **7**: 149–161
- Boulton SJ und Jackson SP** (1996a). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4639–4648
- Boulton SJ und Jackson SP** (1996b). *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.* **15**: 5093–5103
- Boveri T** (1904). Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. Jena: G. Fischer Verlag
- Boyko A, Zemp F, Filkowski J und Kovalchuk I** (2006). Double-strand break repair in plants is developmentally regulated. *Plant Physiol.* **141**: 488–497
- Bray CM und West C** (2005). DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol.* **168**: 511–528
- Britt AB** (1999). Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci.* **4**: 20–25
- Bundock P und Hooykaas P** (2002). Severe developmental defects, hypersensitivity to DNA-damaging agents, and lengthened telomeres in *Arabidopsis* MRE11 mutants. *Plant Cell* **14**: 2451–2462
- Burma S und Chen DJ** (2004). Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **3**: 909–918
- Burma S, Chen BP und Chen DJ** (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* **5**: 1042–1048
- Camerini-Otero RD und Hsieh P** (1995). Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 509–552
- Carroll D, Morton JJ, Beumer KJ und Segal DJ** (2006). Design, construction and *in vitro* testing of zinc finger nucleases. *Nat. Protoc.* **1**: 1329–1341
- Cavalier-Smith T** (2005). Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. *Ann. Bot. (Lond)*. **95**: 147–175

- Chames P, Epinat J-C, Guillier S, Patin A, Lacroix E und Pâques F** (2005). *In vivo* selection of engineered homing endonucleases using double-strand break induced homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* **33**: e178
- Chen BP, Chan DW, Kobayashi J, Burma S, Asaithamby A, Morotomi-Yano K, Botvinick E, Qin J und Chen DJ** (2005). Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.* **280**: 14709–14715
- Chen I-P, Haehnel U, Altschmied L, Schubert I und Puchta H** (2003). The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress - a high-density colony array study (HDCA). *Plant J.* **35**: 771–786
- Chen L, Trujillo K, Sung P und Tomkinson AE** (2000). Interactions of the DNA Ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**: 26196–26205
- Chen L, Trujillo K, Ramos W, Sung P und Tomkinson AE** (2001). Promotion of Dnl4-Catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol. Cell* **8**: 1105–1115
- Chen Z und Zhao H** (2005). A highly sensitive selection method for directed evolution of homing endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **33**: 1–7
- Chiurazzi M, Ray A, Viret J-F, Perera R, Wang X-H, Lloyd A und Signer ER** (1996). Enhancement of somatic intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis* by HO-endonuclease. *Plant Cell* **8**: 2057–2066
- Choulika A, Perrin A, Dujon B und Nicolas J-F** (1994). The yeast I-SceI meganuclease induces site-directed chromosomal recombination in mammalian cells. *CR Acad. Sci. Paris* **317**: 1013–1019
- Choulika A, Perrin A, Dujon B und Nicolas J-F** (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1968–1973
- Clejan I, Boerckel J und Ahmed S** (2006). Developmental modulation of nonhomologous end joining in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **173**: 1301–1317
- Clough SJ und Bent A** (1988). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743
- Colleaux L, d'Auriol L, Betermier M, Cottarel G, Jacquier A, Galibert F und Dujon B** (1986). Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into *E. coli* as a specific double strand endonuclease. *Cell* **44**: 521–533
- Colleaux L, d'Auriol L, Galibert F und Dujon B** (1988). Recognition and cleavage site of the intron encoded omega transposase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6022–6026
- Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA und Parker AR** (2005). The life and death of DNA-PK. *Oncogene* **24**: 949–961
- Constabel F** (1976). Somatic hybridization in higher plants. *In Vitro* **12**: 743–748
- Critchlow SE und Jackson SP** (1998). DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 394–398
- Cromie GA, Connelly JC und Leach DR** (2001). Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol. Cell.* **8**: 1163–1174
- Cui X, Yu Y, Gupta S, Cho YM, Lees-Miller SP und Meek K** (2005). Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell Biol.* **25**: 10842-10852

- Daoudal-Cotterell S, Gallego ME und White CI** (2002). The plant Rad50-Mre11 protein complex. *FEBS Lett.* **516**: 164–166
- Das PO, Levi-Minzi S, Koury M, Benner M und Messing J** (1990). A somatic gene rearrangement contributing to genetic diversity in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7809–7813
- Davey MR, Anthony P, Power JB und Lowe KC** (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* **23**: 131–171
- Decottignies A** (2007). Microhomology-mediated end joining in fission yeast is repressed by pku70 and relies on genes involved in homologous recombination. *Genetics* **176**: 1403–1415
- Deininger PL und Batzer MA** (1999) *Alu* repeats and human disease. *Mol. Genet. Metab.* **67**: 183–193
- Deininger PL, Moran JV, Batzer MA und Kazazian HH Jr** (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**: 651–658
- De Groot MJA, Offringa R, Does MP, Hooykaas PJJ und van den Elzen PJM** (1992). Mechanisms of intermolecular homologous recombination in plants as studied with single- and double-stranded DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **20**: 2785–2794
- Delacôte F und Lopez BS** (2008). Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle* **7**: 33–38
- Devos KM, Brown JK und Bennetzen JL** (2002). Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome Res.* **12**: 1075–1079
- Dion E, Li L, Jean M und Belzile F** (2007). An *Arabidopsis* MLH1 mutant exhibits reproductive defects and reveals a dual role for this gene in mitotic recombination. *Plant J.* **51**: 431–440
- Downs JA und Jackson SP** (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 367–378
- Dronkert ML, Beverloo HB, Johnson RD, Hoeijmakers JH, Jasin M und Kanaar R** (2000). Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell Biol.* **20**: 3147–3156
- Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH und Chandrasegaran S** (2005). Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **33**: 5978–5990
- Durant ST und Nickoloff JA** (2005). Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1. *Cell Cycle* **4**: 1216–1222
- Egli D, Hafen E und Schaffner W** (2004). An efficient method to generate chromosomal rearrangements by targeted DNA double-strand breaks in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **14**: 1382–1393
- Elez M, Radman M und Matic I** (2007). The frequency and structure of recombinant products is determined by the cellular level of MutL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 8935–8940
- Elliott B, Richardson C und Jasin M** (2005). Chromosomal translocation mechanisms at intronic *Alu* elements in mammalian cells. *Mol. Cell* **17**: 885–894
- Emmanuel E, Yehuda E, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolsky N und Levy AA** (2006). The role of AtMSH2 in homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep.* **7**: 100–105
- Engels WR, Johnson-Schlitz D, Flores C, White L und Preston CR** (2007). A third link connecting aging with double strand break repair. *Cell Cycle* **6**: 131–135

- Feldmann E, Schmiemann V, Goedecke W, Reichenberger S und Pfeiffer P** (2000). DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res.* **28**: 2585–2596
- Finette BA** (2006). Analysis of mutagenic V(D)J recombinase mediated mutations at the *HPRT* locus as an *in vivo* model for studying rearrangements with leukemogenic potential in children. *DNA Repair (Amst)* **5**: 1049–1064
- Fishman-Lobell J, Rudin N und Haber JE** (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol. Cell Biol.* **12**: 1292–1303
- Formosa T und Alberts BM** (1986). DNA synthesis dependent on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 proteins. *Cell* **47**: 793–806
- Forsberg J, Landgren, M und Glimelius K** (1994). Fertile somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **95**: 213–223
- Friedman AR und Baker BJ** (2007). The evolution of resistance genes in multi-protein plant resistance systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**: 493–499
- Friesner J und Britt AB** (2003). Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J.* **34**: 427–440
- Gallego ME, Jeanneau M, Granier F, Bouchez D, Bechtold N und White CI** (2001). Disruption of the *Arabidopsis* RAD50 gene leads to plant sterility and MMS sensitivity. *Plant J.* **25**: 31–41
- Gallego ME, Jalut N und White CI** (2003). Telomerase dependence of telomere lengthening in ku80 mutant *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 782–789
- Gellert M** (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 101–132
- Gerstel DU** (1960). Segregation in new allopolyploids of *Nicotiana*. I. Comparison of 6x (*N. tabacum* x *tomentosiformis*) and 6x (*N. tabacum* x *otophora*). *Genetics* **45**: 1723–1734
- Gerstel DU** (1963). Segregation in new allopolyploids of *Nicotiana*. II. Discordant ratios from individual loci in 6x (*N. tabacum* x *N. sylvestris*). *Genetics* **48**: 677–689
- Gherbi H, Gallego ME, Jalut N, Lucht JM, Hohn B und White CI** (2001). Homologous recombination *in planta* is stimulated in the absence of Rad50. *EMBO Rep.* **2**: 287–291
- Gheysen G, Villarreal R und Van Montagu M** (1991). Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev.* **5**: 287–297
- Gisler B, Salomon S und Puchta H** (2002). The role of double-strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells. *Plant J.* **32**: 277–284
- Goodspeed TH** (1954). The genus *Nicotiana*. *Chronica Botanica*, Waltham, Mass. USA
- Gorbunova V und Levy AA** (1997). Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4650–4657
- Gorbunova V und Levy AA** (1999). How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. *Trends Plant Sci.* **4**: 263–269
- Gleba YY und Hoffmann F** (1978). Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris*: no evidence for specific chromosome elimination. *Mol. Gen. Genet.* **165**: 257–264

- Gloor GB, Nassif NA, Johnson-Schlitz DM, Preston CR und Engels WR** (1991). Targeted gene replacement in *Drosophila* via *P* element-induced gap repair. *Science* **253**:1110–1117
- Goedecke W, Pfeiffer P und Vielmetter W** (1994). Nonhomologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe* efficiently eliminates DNA double-strand-breaks from haploid sequences. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2094–2101
- González-Barrera S, Cortés-Ledesma F, Wellinger RE und Aguilera A** (2003). Equal sister chromatid exchange is a major mechanism of double-strand break repair in yeast. *Mol. Cell.* **11**: 1661–1671
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR und Hanahan D** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645–4649
- Gravel S, Larrivée M, Labrecque P und Wellinger RJ** (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**: 741–744
- Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M und Lieber MR** (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**: 492–495
- Greaves MF und Wiemels J** (2003). Origins of chromosome translocations childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 639–649
- Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT und Alt FW** (1997). Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8076–8081
- Gu J, Lu H, Tippin B, Shimazaki N, Goodman MF und Lieber MR** (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J.* **26**: 1010–1023
- Guirouilh-Barbat J, Huck S, Bertrand P, Pirzio L, Desmaze C, Sabatier L und Lopez BS** (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell.* **14**: 611–623
- Haber JE** (1998). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 561–599
- Haber JE** (2000). Partners and pathways: repairing a double-strand break. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 259–264
- Hajdukiewicz P, Svab Z und Maliga P** (1994). The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **25**: 989–994
- Harrington JM und Kolodner RD** (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Msh2-Msh3 acts in repair of base-base mismatches. *Mol. Cell Biol.* **27**: 6546–6554
- Hartung F, Suer S, Bergmann T und Puchta H** (2006). The role of AtMUS81 in DNA repair and its genetic interaction with the helicase AtRecQ4A. *Nucleic Acids Res.* **34**: 4438–4448
- Hartung F, Suer S und Puchta H** (2007). Two closely related RecQ helicases have antagonistic roles in homologous recombination and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 18836–18841
- Hays JB** (2002). *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair (Amst)* **1**: 579–600
- Hefferin ML und Tomkinson AE** (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**: 639–648

- Hensgens LAM, Bonen L, de Haan M, van der Horts G und Grivell LA** (1983). Two intron sequences in yeast mitochondrial *COXI* gene: homology among URF-containing introns and strain-dependent variation in flanking exons. *Cell* **32**: 379–389
- Hess JL** (2004). Mechanisms of transformation by MLL. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **14**: 235–254
- Heyer WD, Li X, Rolfsmeier M und Zhang XP** (2006). Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.* **34**: 4115–4125
- Hiei Y, Ohta S, Komari T und Kumashiro T** (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6**: 271–282
- Hinnisdaels S, Negrutiu I, Jacobs M und Sidorov V** (1988). Plant somatic cell hybridizations: evaluations and prospectives. *Nat. Assoc. Plant Tissue Cult. Newsl.* **55**: 2–10
- Hinnisdaels S, Bariller L, Mouras A, Sidorov V, Del-Favero J, Veuskens J, Negrutiu I und Jacobs M** (1991). Highly asymmetric intergeneric nuclear hybrids between *Nicotiana* and *Petunia*: evidence for recombinogenic and translocation events in somatic hybrid plants after “gamma”-fusion. *Theor. Appl. Genet.* **82**: 609–614
- Hinnisdaels S, Mouras A, Salesses G, Veuskens J, Taylor C, Gharti-Chhetri GB, Negrutiu I und Jacobs M** (1992). Translocation events demonstrated by molecular *in situ* hybridization and chromosome pairing analyses in highly asymmetric somatic hybrid plants. *Transgenic Res.* **1**: 170–176
- Hoeijmakers JHJ** (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366–374
- Holliday R** (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* **5**: 282–304.
- Hrouda M und Paszkowski J** (1994). High fidelity extrachromosomal recombination and gene targeting in plants. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 106–111
- Huang J und Dynan WS** (2002). Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res.* **30**: 667–674
- Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Phelan T, Spiker S, Matzke MA und Matzke AJ** (1997). Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* **9**: 1251–1264
- Inbar O und Kupiec** (1999). Homology search and choice of homologous partner during mitotic recombination. *Mol. Cell Biol.* **19**: 4134–4142
- Inbar O, Liefshitz B, Bitan G und Kupiec M** (2000). The relationship between homology length and crossing over during the repair of a broken chromosome. *J. Biol. Chem.* **275**: 30833–30838
- Ivanov EL, Sugawara N, Fishman-Lobell J und Haber JE** (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**: 693–704
- Jacquier A und Dujon B** (1985). An intron encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* **41**: 383–394
- Johnson-Schlitz DM und Engels WR** (2006a). The effect of gap length on double-strand break repair in *Drosophila*. *Genetics* **173**: 2033–2038
- Johnson-Schlitz D und Engels WR** (2006b). Template disruptions and failure of double Holliday junction dissolution during double-strand break repair in *Drosophila* BLM mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 16840–16845

- Johnson-Schlitz DM, Flores C und Engels WR** (2007). Multiple-pathway analysis of double-strand break repair mutations in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **3**: e50
- Jurica MS und Stoddard BL** (1999). Homing endonucleases: structure, function and evolution. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 1304–1326
- Kadyk LC und Hartwell LH** (1992). Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **132**: 387–402
- Karmakar P, Piotrowski J, Brosh RM Jr, Sommers JA, Miller SP, Cheng WH, Snowden CM, Ramsden DA und Bohr VA** (2002). Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase *in vivo* and *in vitro*, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**: 18291–18302
- Keeler KJ und Gloor GB** (1997). Efficient gap repair in *Drosophila melanogaster* requires a maximum of 31 nucleotides of homologous sequence at the searching ends. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 627–634
- Kim JS, Krasieva TB, Kurumizaka H, Chen DJ, Taylor AM und Yokomori K** (2005). Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **170**: 341–347
- Kirik A, Salomon S und Puchta H** (2000). Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants. *EMBO J.* **19**: 5562–5566
- Köhler F, Cardon G, Pöhlman M, Gill R und Schieder O** (1989). Enhancement of transformation rates in higher plants by low-dose irradiation: Are DNA repair systems involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome? *Plant Mol. Biol.* **12**: 189–199
- Kohli A, Griffiths S, Palacios N, Twyman RM, Vain P, Laurie DA und Christou P** (1999). Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant J.* **17**: 591–602
- Kolodner RD, Putnam CD und Myung K** (2002). Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**: 552–557
- Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A und Squire JA** (2002). The role of *Alu* repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **35**: 97–112
- Koncz C, Kreuzaler F, Kalman Z und Schell J** (1984). A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. *EMBO J.* **3**: 1029–1037
- Koshinsky HA, Lee E und Ow DW** (2000). *Cre-lox* site-specific recombination between *Arabidopsis* and tobacco chromosomes. *Plant J.* **23**: 715–722
- Kostriken R, Strathern JN, Klar AJ, Hicks JB und Heffron F** (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **35**: 167–174
- Kostriken R und Heffron F** (1984). The product of the HO gene is a nuclease: purification and characterization of the enzyme. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **49**: 89–96
- Kovalchuk I, Kovalchuk O, Arkhipov A und Hohn B** (1998). Transgenic plants are sensitive bioindicators of nuclear pollution caused by the Chernobyl accident. *Nat. Biotechnol.* **16**: 1054–1059
- Kovalchuk I, Kovalchuk O und Hohn B** (2001a). Biomonitoring the genotoxicity of environmental factors with transgenic plants. *Trends Plant. Sci.* **6**: 306–310
- Kovalchuk I, Kovalchuk O, Kalck V, Boyko V, Filkowski J, Heinlein M und Hohn B** (2003). Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. *Nature* **423**: 760–762

- Kovalchuk O, Arkhipov A, Barylyak I, Karachov I, Titov V, Hohn B und Kovalchuk I** (2000). Plants experiencing chronic internal exposure to ionizing radiation exhibit higher frequency of homologous recombination than acutely irradiated plants. *Mutat. Res.* **449**: 47–56
- Kovalchuk O, Kovalchuk I, Titov V, Arkhipov A und Hohn B** (1999). Radiation hazard caused by the Chernobyl accident in inhabited areas of Ukraine can be monitored by transgenic plants. *Mutat. Res.* **446**: 49–55
- Kovalchuk O, Titov V, Hohn B und Kovalchuk I** (2001b). A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nat. Biotechnol.* **19**: 568–572
- Kramer KM, Brock JA, Bloom K, Moore JK und Haber JE** (1994). Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar RAD52-independent, nonhomologous recombination events. *Mol. Cell Biol.* **14**: 1293–1301
- Krizkova L und Hrouda M** (1998). Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions. *Plant J.* **16**: 673–681
- Krogh BO und Symington LS** (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 233–271
- Lafleuriel J, Degroote F, Depeiges A und Picard G** (2007). Impact of the loss of AtMSH2 on double-strand break-induced recombination between highly diverged homeologous sequences in *Arabidopsis thaliana* germinal tissues. *Plant Mol. Biol.* **63**: 833–846
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, 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 JP, 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 JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S und Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860–921

- Lazo GR, Stein PA und Ludwig RA** (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/Tech.* **9**: 963–967
- Leach DRF** (1996). Genetic Recombination. Blackwell Science, Oxford
- Lebel EG, Masson J, Bogucki A und Paszkowski J** (1993). Stress-induced intrachromosomal recombination in plant somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 422–426
- Lee SE, Mitchell RA, Cheng A und Hendrickson EA** (1997). Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **17**:1425–1433
- Lehman CW, Trautman JK und Carroll D** (1994). Illegitimate recombination in *Xenopus*: characterization of end-joined junctions. *Nucleic Acids Res.* **22**: 434–442
- Leister D** (2004). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance gene. *Trends Genet.* **20**: 116–122
- Li L, Santerre-Ayotte S, Boivin EB, Jean M und Belzile F** (2004). A novel reporter for intrachromosomal homoeologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **40**: 1007–1015
- Li L, Jean M und Belzile F** (2006). The impact of sequence divergence and DNA mismatch repair on homeologous recombination in *Arabidopsis*. *Plant J.* **45**: 908–916
- Li X und Heyer WD** (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* **18**: 99–113
- Liang F, Romanienko PJ, Weaver DT, Jeggo PA und Jasin M** (1996). Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8929–8933
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U und Schwarz K** (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**: 712–720
- Lin F-L, Sperle K und Sternberg N** (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: Role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell Biol.* **4**: 1020–1034
- Lin F-L, Sperle K und Sternberg N** (1990). Intermolecular recombination between DNAs introduced into mouse L cells is mediated by a nonconservative pathway that leads to crossover products. *Mol. Cell Biol.* **10**: 103–112
- Lindahl T** (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709–715
- Liu F, Ryschka U, Marthe F, Klocke E, Schumann G und Zhao H** (2007). Culture and fusion of pollen protoplasts of *Brassica oleracea* L. var. *italica* with haploid mesophyll protoplasts of *B. rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Protoplasma* **231**: 89–97
- Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D und Drews GN** (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 2232–2237
- Lowe B, Mathern J und Hake S** (1992). Active *Mutator* elements suppress the knotted phenotype and increase recombination at the Kn1-O tandem duplication. *Genetics* **132**: 813–822
- Loyola-Vargas VM und Vázquez-Flota F** (2006). An introduction to plant cell culture: back to the future. *Methods Mol. Biol.* **318**: 3–8
- Lucht JM, Mauch-Mani B, Steiner HY, Mettraux, JP, Ryals J und Hohn B** (2002). Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* **30**: 311–314
- Lundblad V und Blackburn EH** (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**: 347–360

- Lydeard JR, Jain S, Yamaguchi M und Haber JE** (2007). Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature* **448**: 820–823
- Lyznik LA, McGee JD, Tung P-T, Bennetzen JL und Hodges JK** (1991). Homologous recombination between plasmid DNA molecules in maize protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 209–218
- Ma JL, Kim EM, Haber JE und Lee SE** (2003). Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol. Cell Biol.* **23**: 8820–8828
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K und Lieber MR** (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-Dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**: 781–794
- Ma Y, Schwarz K und Lieber MR** (2005) The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)* **4**: 845–851
- Maggert KA und Golic KG** (2005). Highly efficient sex chromosome interchanges produced by I-Crel expression in *Drosophila*. *Genetics* **171**: 1103–1114
- Maliga P, Sz-Breznovits A und Márton L** (1973). Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nat. New Biol.* **244**: 29–30
- Malone RE, Ward T, Lin S und Waring J** (1990). The RAD50 gene, a member of the double strand break repair epistasis group, is not required for spontaneous mitotic recombination in yeast. *Curr. Genet.* **18**: 111–116
- Martin S, Laroche T, Suka N, Grunstein M und Gasser SM** (1999). Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* **97**: 621–633
- Martin IV und MacNeill SA** (2002). ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol.* **3**: 1–7
- Maryon E und Carroll D** (1991). Involvement of single-stranded tails in homologous recombination of DNA injected into *Xenopus laevis* oocyte nuclei. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3268–3277
- Mason RM, Thacker J und Fairman MP** (1996). The joining of non-complementary DNA double-strand breaks by mammalian extracts. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4946–4953
- Matsumoto S, Ito Y, Hosoi T, Takahashi Y und Machida Y** (1990). Integration of *Agrobacterium* T-DNA into a tobacco chromosome: possible involvement of DNA homology between T-DNA and plant DNA. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 309–316
- Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Bakkeren G, Cramer A, Angelis K, Redei G, Schell J, Hohn B und Koncz C** (1991). T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.* **10**: 271–280
- McClintock B** (1931). Cytological observations of deficiencies involving known genes, translocations and an inversion in *Zea mays*. *Mo. Agric. Exp. Res. Stn. Res. Bull.* **163**: 1–30
- McClintock B** (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science* **226**: 792–801
- McEachern MJ und Haber JE** (2006). Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 111–135
- Meza TJ, Kamfjord D, Håkelién A-M, Evans I, Godager LH, Mandal A, Jakobsen KS und Aalen RB** (2001). The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Res.* **10**: 53–67

- Migeon BR und Miller CS** (1968). Human–mouse somatic cell hybrids with single human chromosome (group E): link with thymidine kinase activity. *Science* **162**: 1005–1006
- Mitelman F, Mertens F und Johansson B** (1997a). A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet.* **15**: 417–474
- Mitelman F, Johansson B, Mandahl und Mertens F** (1997b). Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* **95**: 1–8
- Molinier J, Stamm M-E und Hohn B** (2004) SNM-dependent recombinational repair of oxidatively induced DNA damage in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep.* **5**: 994–999
- Molinier J, Ries G, Zipfel C und Hohn B** (2006). Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* **442**: 1046–1049
- Monteilhet C, Perrin A, Thierry A, Colleaux L und Dujon B** (1990). Purification and characterization of the *in vitro* activity of I-SceI, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group I intron. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1407–1413
- Moore JK and Haber JE** (1996). Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks. *Nature* **383**: 644–646
- Mosig G** (1998). Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 379–413
- Moure CM, Gimble FS und Quiocho FA** (2003). The crystal structure of the gene targeting homing endonuclease I-SceI reveals the origins of its target site specificity. *J. Mol. Biol.* **334**: 685–695
- Nassif N, Penny J, Pal S, Engels WR und Gloor GB** (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites *via P*-element induced gap repair. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1613–1625
- Negrutiu I, Hinnisdaels S, Cammaerts D, Cherdshewasart W, Gharti-Chhetri G und Jacobs M** (1992). Plant protoplasts as genetic tool: selectable markers for developmental studies. *Int. J. Dev. Biol.* **36**: 73–84
- Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J und Ramsden DA** (2000). Ku recruits the XRCC4-Ligase IV complex to DNA ends. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 2996–3003
- Nickoloff JA, Chen EY und Heffron F** (1986). A 24-base-pair DNA sequence from the MAT locus stimulates intergenic recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7831–7835
- Nicolas AL, Munz PL und Young CS** (1995). A modified single strand annealing model best explains the joining of DNA doublestrand breaks in mammalian cells and cell extracts. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1036–1043
- Nussenzweig A, Sokol K, Burgman P, Li L und Li GC** (1997). Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on growth, survival, and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13588–13593
- Offringa R, de Groot MJA, Haagsman HJ, Does MP, van den Elzen PJM und Hooykaas PJJ** (1990). Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after *Agrobacterium* mediated transformation. *EMBO J.* **9**: 3077–3084
- Ohba T, Yoshioka Y, Machida C und Machida Y** (1995). DNA rearrangement associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example for multiple duplications of DNA around the integration target. *Plant J.* **7**: 157–164
- Ohno S** (1970). Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, Berlin
- Oliver MJ, Petrov D, Ackerly D, Falkowski P und Schofield OM** (2007). The mode and tempo of genome size evolution in eukaryotes. *Genome Res.* **17**: 594–601

- Onno M, Nakamura T, Hillova J, Hill M** (1992). Rearrangement of the human *trc* oncogene by homologous recombination between *Alu* repeats of nucleotide sequences from two different chromosomes. *Oncogene* **7**: 2519–2523
- Opperman R, Emmanuel E und Levy AA** (2004). The effect of sequence divergence on recombination between direct repeats in *Arabidopsis*. *Genetics* **168**: 2207–2215
- Orel N und Puchta H** (2003). Differences in the processing of DNA ends in *Arabidopsis* and tobacco and its implication for genome evolution. *Plant Mol. Biol.* **51**: 523–531
- Orel N, Kirik A und Puchta H** (2003). Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J.* **35**: 604–612
- Orii KE, Lee Y, Kondo N und McKinnon PJ** (2006). Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 10017–10022
- Osakabe K, Abe K, Yoshioka T, Osakabe Y, Todoriki S, Ichikawa H, Hohn B und Toki S** (2006). Isolation and characterization of the RAD54 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **48**: 827–842
- Palmer S, Schildkraut E, Lazarin R, Nguyen J und Nickoloff JA** (2003). Gene conversion tracts in *Saccharomyces cerevisiae* can be extremely short and highly directional. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1164–1173
- Pang D, Yoo S, Dynan WS, Jung M und Dritschilo A** (1997). Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res.* **57**: 1412–1415
- Papp I, Iglesias VA, Moscone EA, Michalowski S, Spiker S, Park YD, Matzke MA und Matzke AJ** (1996). Structural instability of a transgene locus in tobacco is associated with aneuploidy. *Plant J.* **10**: 469–478
- Papworth M, Kolasinska P und Minczuk M** (2005) Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene* **366**: 27–38
- Pâques F und Haber JE** (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 349–404
- Parniske M, Hammond-Kosack KE, Golstein C, Thomas CM, Jones DA, Harrison K, Wulff BB und Jones JD** (1997). Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. *Cell* **91**: 821–832
- Parniske M und Jones JD** (1999). Recombination between diverged clusters of the tomato Cf-9 plant disease resistance gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5850–5855
- Pastwa E und Blasiak J** (2003). Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim. Pol.* **50**: 891–908
- Paszkowski J, Peterhans A, Bilang R und Filipowicz W** (1992). Expression in transgenic tobacco of the bacterial neomycin phosphotransferase gene modified by intron insertions of various sizes. *Plant Mol. Biol.* **19**: 825–836
- Pellicer A, Robins D, Wold B, Sweet R, Jackson J, Lowy I, Roberts JM, Sim GK und Silverstein S** (1980). Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer. *Science* **209**: 1414–1422
- Perrin A, Buckle M und Dujon B** (1993). Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions. *EMBO J.* **12**: 2939–2947
- Perucho M, Hanahan D und Wigler M** (1980). Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. *Cell* **22**: 309–317

- Petrov DA, Lozovskaya ER und Hartl DL** (1996). High intrinsic rate of DNA loss in *Drosophila*. *Nature* **384**: 346–349
- Petrov D** (1997). Slow but steady: reduction of genome size through biased mutation. *Plant Cell* **9**: 1900–1901
- Petrov DA, Sangster TA, Johnston JS, Hartl DL und Shaw KL** (2000). Evidence for DNA loss as a determinant of genome size. *Science* **287**: 1060–1062
- Petrov DA** (2001). Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.* **17**: 23–28
- Petrov DA** (2002). DNA loss and evolution of genome size in *Drosophila*. *Genetica* **115**: 81–91
- Pfeiffer P und Vielmetter W** (1988). Joining of nonhomologous DNA double strand breaks *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 907–924
- Pfeiffer P, Thode S, Hancke J und Vielmetter W** (1994). Mechanisms of overlap formation in nonhomologous DNA end joining. *Mol. Cell Biol.* **14**: 888–895
- Pfeiffer P, Goedecke W und Obe G** (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* **15**: 289–302
- Piastuch WC und Bates GW** (1990). Chromosomal analysis of *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids by dot blotting and *in situ* hybridization. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 97–103
- Pipiras E, Coquelle A, Bieth A und Debatisse M** (1998). Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *EMBO J.* **17**: 325–333
- Pitcher RS, Brissett NC, Picher AJ, Andrade P, Juarez R, Thompson D, Fox GC, Blanco L und Doherty AJ** (2007a). Structure and function of a mycobacterial NHEJ DNA repair polymerase. *J. Mol. Biol.* **366**: 391–405
- Pitcher RS, Brissett NC, Doherty AJ** (2007b). Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 259–282
- Plank JL, Chu SH, Pohlhaus JR, Wilson-Sali T und Hsieh TS** (2005). *Drosophila melanogaster* topoisomerase III alpha preferentially relaxes a positively or negatively supercoiled bubble substrate and is essential during development. *J. Biol. Chem.* **280**: 3564–3573
- Plichova H, Hartung F und Puchta H** (2003). Biochemical characterization of an exonuclease from *Arabidopsis thaliana* reveals similarities to the DNA exonuclease of the human Werner syndrome protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 44128–44138
- Plessis A, Perrin A, Haber EJ und Dujon B** (1992). Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease in the yeast nucleus. *Genetics* **130**: 451–460
- Preston CR, Engels W und Flores C** (2002). Efficient repair of DNA breaks in *Drosophila*: evidence for single-strand annealing and competition with other repair pathways. *Genetics* **161**: 711–720
- Preston CR, Flores CC und Engels WR** (2006a). Differential usage of alternative pathways of double-strand break repair in *Drosophila*. *Genetics* **172**: 1055–1068
- Preston CR, Flores C und Engels WR** (2006b). Age-dependent usage of double-strand-break repair pathways. *Curr. Biol.* **16**: 2009–2015
- Puchta H und Hohn B** (1991a). A transient assay in plant cells reveals a positive correlation between extrachromosomal recombination rates and length of homologous overlap. *Nucleic Acids Res.* **19**: 2693–2700

- Puchta H und Hohn B** (1991b). The mechanism of extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 1–7
- Puchta H, Kocher S und Hohn B** (1992). Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells is fast and is not affected by CpG methylation. *Mol. Cell Biol.* **12**: 3372–3379
- Puchta H, Dujon B und Hohn B** (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5034–5040
- Puchta H und Meyer P** (1994). Substrate specificity of plant recombinases determined in extrachromosomal recombination systems. In: Paszkowski J, (Ed.) *Homologous recombination in plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer-Verlag, 123–155
- Puchta H, Swoboda P, Gal S, Blot M und Hohn B** (1995). Somatic intrachromosomal homologous recombination events in populations of plant siblings. *Plant Mol. Biol.* **28**: 281–292
- Puchta H, Dujon B und Hohn B** (1996). Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5055–5060
- Puchta H** (1998). Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. *Plant J.* **13**: 331–339
- Puchta H** (1999). DSB-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics* **152**: 1173–1181
- Puchta H** (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J. Exp. Bot.* **56**: 1–14
- Puizina J, Siroky J, Mokros P, Schweizer D und Riha K** (2004). Mre11 deficiency in *Arabidopsis* is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *Plant Cell* **16**: 1968–1978
- Qin M, Bayley C, Stockton T und Ow DW** (1994). Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1706–1710
- Rabbitts TH** (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372**: 143–149
- Ralston EJ, English JJ und Dooner HK** (1988). Sequence of three bronze alleles of maize and correlation with the genetic fine structure. *Genetics* **119**: 185–197
- Ramakrishna W, Emberton J, SanMiguel P, Ogden M, Llaca V, Messing J und Bennetzen JL** (2002). Comparative sequence analysis of the sorghum rph region and the maize *rp1* resistance gene complex. *Plant Physiology* **130**: 1728–1738
- Ramos W, Liu G, Giroux CN und Tomkinson AE** (1998). Biochemical and genetic characterization of the DNA ligase encoded by *Saccharomyces cerevisiae* open reading frame YOR005c, a homolog of mammalian DNA ligase IV. *Nucleic Acids Res.* **26**: 5676–5683
- Ray A und Langer M** (2002). Homologous recombination: ends as the means. *Trends Plant Sci.* **7**: 435–440
- Rédei GP** (1962). Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **47**: 443–460
- Rédei GP und Li SL** (1969). Effects of 'X' rays and ethyl methanesulfonate on the chlorophyll B locus in the soma and on the thiamine loci in the germline of *Arabidopsis*. *Genetics* **61**: 453–459
- Ren N und Timko MP** (2001). AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome* **44**: 559–571

- Ricchetti M, Fairhead C und Dujon B** (1999). Mitochondrial DNA repairs double-strand breaks in yeast chromosomes. *Nature* **402**: 96–100
- Richardson C, Moynahan ME und Jasin M** (1998). Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev.* **12**: 3831–3842
- Richardson C und Jasin M** (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* **405**: 697–700
- Richter TE, Pryor TJ, Bennetzen JL und Hulbert SH** (1995). New rust resistance specificities associated with recombination in the *Rp1* complex in maize. *Genetics* **141**: 373–381
- Reidt W, Wurz R, Wanieck K, Chu HH und Puchta H** (2006). A homologue of the breast cancer associated gene BARD1 is involved in DNA repair in plants. *EMBO J.* **25**: 4326–4337
- Reiss B, Schubert I, Köpchen K, Wendeler E, Schell J und Puchta H** (2000). RecA stimulates sister chromatid exchange and the fidelity of double-strand break repair, but not gene targeting, in plants transformed by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3358–3363
- Reiss B** (2003). Homologous recombination and gene targeting in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **228**: 85–139
- Ricchetti M, Dujon B und Fairhead C** (2003). Distance from the chromosome end determines the efficiency of double strand break repair in subtelomeres of haploid yeast. *J. Mol. Biol.* **328**: 847–862
- Ries G, Buchholz G, Frohnmeyer H und Hohn B** (2000a). UV-damage-mediated induction of homologous recombination in *Arabidopsis* is dependent on photosynthetically active radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13425–13429
- Ries G, Heller W, Puchta H, Sandermann H, Seidlitz HK und Hohn B** (2000b). Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* **406**: 98–101
- Riha K, Heacock ML und Shippen DE** (2006). The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology. *Annu. Rev. Genet.* **40**: 237–277
- Rinehart TA, Dean C und Weil CF** (1997). Comparative analysis of non-random DNA repair following *Ac* transposon excision in maize and *Arabidopsis*. *Plant J.* **12**: 1419–1427
- Rivera-Calzada A, Spagnolo L, Pearl LH und Llorca O** (2007). Structural model of full-length human Ku70–Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. *EMBO J.* **8**: 56–62
- Roeder GS** (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* **11**: 2600–2621
- Rong YS und Golic KG** (2003). The homologous chromosome is an effective template for the repair of mitotic DNA double-strand breaks in *Drosophila*. *Genetics* **165**: 1831–1842
- Roth DB, Porter TN und Wilson JH** (1985). Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **5**: 2599–2607
- Roth DB und Wilson JH** (1988). Illegitimate recombination in mammalian cells. In *Genetic recombination*, Kucherlapati R und Smith GR (Edts.), American Society of Microbiology, Washington, USA, Pp. 621–635
- Roth DB und Wilson JH** (1989). Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol. Cell Biol.* **6**: 4295–4304
- Roth DB** (2003). Restraining the V(D)J recombinase. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 656–666
- Rubin E und Levy AA** (1997). Abortive gap repair: the underlying mechanism for *Ds* elements formation. *Mol. Cell Biol.* **17**: 6294–6302

- Saedler H und Nevers P** (1985). Transposition in plants: a molecular model. *EMBO J.* **4**: 585–590
- Salomon S und Puchta H** (1998). Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J.* **17**: 6086–6095
- Sambrook J und Russell DW** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York
- San Filippo J, Sung P und Klein H** (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 9.1–9.29
- SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z und Bennetzen JL** (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**: 765–768
- SanMiguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y und Bennetzen JL** (1998). The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat. Genet.* **20**: 43–45
- Sargent RG, Brenneman MA und Wilson JH** (1997). Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol. Cell Biol.* **17**: 267–277
- Schär P, Herrmann G, Daly G und Lindahl T** (1997). A newly identified DNA ligase of *Saccharomyces cerevisiae* involved in RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* **11**: 1912–1924
- Schmidt-Puchta W, Orel N, Kirik A und Puchta H** (2004). Intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol. Biol.* **262**: 25–35
- Schofield MJ und Hsieh P** (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 579–608
- Schuermann D, Molinier J, Fritsch O und Hohn B** (2005). The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet.* **21**: 172–181
- Schultze M, Hohn T und Jiricny J** (1990). The reverse transcriptase gene of cauliflower mosaic virus is translated separately from the capsid gene. *EMBO J.* **9**: 1177–1185
- Schwacha A und Kleckner N** (1995). Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell* **83**: 783–791
- Scott L, Lafoe D und Weil C** (1996). Adjacent sequences influence DNA repair accompanying transposon excision in maize. *Genetics* **142**: 237–246
- Shaked H, Avivi-Ragolsky N und Levy AA** (2006). Involvement of the *Arabidopsis* SWI2/SNF2 chromatin remodeling gene family in DNA damage response and recombination. *Genetics* **17**: 985–994
- Shalev G und Levy AA** (1997). The maize transposable element *Ac* induces recombination between the donor site and an homologous ectopic sequence. *Genetics* **146**: 1143–1151
- Shao RG, Cao CX, Zhang H, Kohn KW, Wold MS und Pommier Y** (1999). Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. *EMBO J.* **18**: 1397–1406
- Sheng X, Liu F, Zhu Y, Zhao H, Zhang L und Chen B** (2008). Production and analysis of intergeneric somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Matthiola incana*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **92**: 55–62
- Shin DS, Chahwan C, Huffman JL und Tainer JA** (2004). Structure and function of the double-strand break machinery. *DNA Repair (Amst)* **3**: 863–873

- Shirley BW, Hanley S und Goodman HM** (1992). Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *Plant Cell* **4**: 333–347
- Shrivastav M, De Haro LP und Nickoloff JA** (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* **18**:134–47
- Shuman S und Glickman MS** (2007). Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 852–861
- Siebert R und Puchta H** (2002). Efficient repair of genomic double-strand breaks *via* homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell* **14**: 1121–1131
- Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, Prieto J, Redondo P, Blanco FJ, Bravo J, Montoya G, Pâques F und Duchateau P** (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**: e149
- Smith CE, Llorente B und Symington LS** (2007). Template switching during break-induced replication. *Nature* **447**: 102–105
- Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, Taniguchi Y und Takeda S** (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* **5**: 1021–1029
- Stark JM, Pierce AJ, Oh J, Pastink A und Jasin M** (2004). Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol. Cell Biol.* **24**: 9305–9316
- Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD und Caligiuri MA** (1998). The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by *Alu*-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2390–2395
- Sugawara N, Ira G und Haber JE** (2002). DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol. Cell Biol.* **20**: 5300–5309
- Sugawara N, Goldfarb T, Studamire B, Alani E und Haber JE** (2004). Heteroduplex rejection during single-strand annealing requires Sgs1 helicase and mismatch repair proteins Msh2 and Msh6 but not Pms1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 9315–9320
- Sutton WS** (1903). The chromosomes in heredity. *Biol. Bull.* **4**: 231–251
- Swoboda P, Gal S, Hohn B und Puchta H** (1994). Intrachromosomal homologous recombination in whole plants *EMBO J.* **13**: 484–489
- Symington LS** (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 630–670
- Szcepek M, Brondani V, Buchel J, Serrano L, Segal DJ und Cathomen T** (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **25**: 786–793
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ und Stahl FW** (1983). The double-strand break repair model of recombination. *Cell* **33**: 25–35
- Takano M, Egawa H, Ikeda JE und Wakasa K** (1997). The structures of integration sites in transgenic rice. *Plant J.* **11**: 353–361
- Tamura K, Adachi Y, Chiba K, Oguchi K und Takahashi H** (2002). Identification of Ku70 and Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double-strand breaks. *Plant J.* **29**: 771–781

- Tan G, Gao Y, Shi M, Zhang X, He S, Chen Z und An C** (2005). SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Res.* **33**: 1–7
- Teng SC, Kim B und Gabriel A** (1996). Retrotransposon reverse-transcriptase mediated repair of chromosomal breaks. *Nature* **383**: 641–644
- Teo SH und Jackson SP** (2000). Lif1p targets the DNA ligase Lig4p to sites of DNA double-strand breaks. *Curr. Biol.* **10**: 165–168
- Thode S, Schäfer A, Pfeiffer P und Vielmetter W** (1990). A novel pathway of DNA end-to-end joining. *Cell* **60**: 921–928
- Tinland B, Hohn B und Puchta H** (1994). *Agrobacterium tumefaciens* transfers single stranded T-DNA into the plant cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8000–8004
- Tinland B** (1996). The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* **1**: 178–184
- Tobacco Genome Initiative. Gadani F, Hayes A, Opperman CH, Lommel SA, Sosinski BR, Burke M, Hi L, Brierly R, Salstead A, Heer J, Fuelner G und Lakey N** (2003). Large scale genome sequencing and analysis of *Nicotiana tabacum*: the tobacco genome initiative. In: *Proceedings, 5èmes Journées Scientifiques du Tabac de Bergerac* 117–130
- Tovar J und Lichtenstein C** (1992). Somatic and meiotic chromosomal recombination between inverted duplications in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4**: 319–332
- Trouiller B, Schaefer DG, Charlot F und Nogué F** (2006). MSH2 is essential for the preservation of genome integrity and prevents homeologous recombination in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Res.* **34**: 232–242
- Trujillo KM und Sung P** (2001). DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50/Mre11 complex. *J. Biol. Chem.* **276**: 35458–35464
- Tsukamoto Y und Ikeda H** (1998). Double-strand break repair mediated by DNA end-joining. *Genes Cells* **3**: 135–144
- Tuteja N, Singh MB, Misra MK, Bhalla PL und Tuteja R** (2001). Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**: 337–397
- Tycko B und Sklar J** (1990). Chromosomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model. *Cancer Cells* **2**: 1–8
- Udall JA, Quijada PA und Osborn TC** (2005). Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics* **169**: 967–979
- Udayakumar D, Bladen CL, Hudson FZ und Dynan WS** (2003). Distinct pathways of nonhomologous end joining that are differentially regulated by DNA-dependent protein kinase-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**: 41631–41635
- van Attikum H, Bundock P, Overmeer RM, Lee L-Y, Gelvin SB und Hooykaas PJJ** (2003). The *Arabidopsis* AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of *Agrobacterium* T-DNA. *Nucleic Acids Res.* **31**: 4247–4255
- Walbot V** (1985). On the life strategies of plants and animals. *Trends Genet.* **1**: 165–169
- Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H und Iliakis G** (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* **34**: 6170–6182
- Wei DS und Rong YS** (2007). A genetic screen for DNA double-strand break repair mutations in *Drosophila*. *Genetics* **177**: 63–77

- Weinstock DM, Richardson CA, Elliott B und Jasin M** (2006). Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*. **5**: 1065–1074
- Weiss MC und Green H** (1967). Human–mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **58**: 1104–1111
- Wessler S, Tarpley A, Purugganan M, Spell M und Okagaki R** (1990). Filler DNA is associated with spontaneous deletions in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8731–8735
- West SC** (1997). Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 213–244
- West CE, Waterworth WM, Jiang Q und Bray CM** (2000). *Arabidopsis* DNA ligase IV is induced by γ -irradiation and interacts with an *Arabidopsis* homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant J.* **24**: 67–78
- West C, Waterworth WM, Story GW, Sunderland PA, Jiang Q und Bray CM** (2002). Disruption of the *Arabidopsis* AtKu80 gene demonstrates an essential role for AtKu80 protein in efficient repair of DNA double-strand breaks *in vivo*. *Plant J.* **31**: 517–528
- West SC** (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**: 435–445
- Whitby MC** (2005). Making crossovers during meiosis. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 1451–1455
- Wilson JH, Berget PB und Pipas JM** (1982). Somatic cells efficiently join unrelated DNA segments end-to-end. *Mol. Cell Biol.* **2**: 1258–1269
- Wilson TE und Lieber MR** (1999). Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. Evidence for a DNA polymerase beta (Pol4)-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **274**: 23599–23609
- Wirz U, Schell J und Czernilofsky AP** (1987). Recombination of selectable marker DNA in *Nicotiana tabacum*. *DNA* **6**: 245–253
- Wolters A-M, Vergunst AC, van der Werff F und Koorneef M** (1993). Analysis of nuclear and organellar DNA of somatic hybrid calli and plants between *Lycopersicon* spp. & *Nicotiana* spp. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 707–718
- Wright D, Townsend J, Winfrey R, Irwin P, Rajagopal J, Lonosky P, Hall B, Jondle M und Voytas D** (2005) High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J.* **44**: 693–705
- Wu D, Topper LM und Wilson TE** (2008). Recruitment and dissociation of nonhomologous end joining proteins at a DNA double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**: *in press*
- Wulff BB, Thomas CM, Parniske M und Jones JD** (2004). Genetic variation at the tomato Cf-4/Cf-9 locus induced by EMS mutagenesis and intralocus recombination. *Genetics* **167**: 459–470
- Wyman C und Kanaar R** (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* **40**: 363–383
- Xiao YL und Peterson T** (2000). Intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis* induced by a maize transposon. *Mol. Gen. Genetics* **263**: 22–29
- Xiao YL, Li X und Peterson T** (2000). *Ac* insertion site affects the frequency of transposon-induced homologous recombination at the maize *p1* locus. *Genetics* **156**: 2007–2017

- Yamagishi H, Landgren M, Forsberg J und Glimelius K** (2002). Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theor. Appl. Genet.* **104**: 959–964
- Yaneva M, Kowalewski T und Lieber MR** (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* **16**: 5098–5112
- Yannone SM, Roy S, Chan DW, Murphy MB, Huang S, Campisi J und Chen DJ** (2001). Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **276**: 38242–38248
- Yu X und Gabriel A** (2004). Reciprocal translocations in *Saccharomyces cerevisiae* formed by nonhomologous end joining. *Genetics* **166**: 741–751
- Zarrin AA, Del Vecchio C, Tseng E, Gleason M, Zarin P, Tian M und Alt FW** (2007). Antibody class switching mediated by yeast endonuclease-generated DNA breaks. *Science* **315** :377–381
- Zhong Q, Boyer TG, Chen PL und Lee WH** (2002). Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brca1-null fibroblasts. *Cancer Res.* **62**: 3966–3970

8 Anhang

8.1 Primer

Tabelle 8.1: Primer. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer sind angegeben. Bei den Primern aacC1-n-FW, -RV und -i-RV sind die zu Klonierungszwecken verwendeten *KpnI*-Schnittstellen kursiv und unterstrichen dargestellt, die I-SceI-Erkennungssequenz ist rot hervorgehoben.

Name	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
KIH2	CGTGGCTGGCCTCCTTCAATGTAA	Nachweis & Sequenzierung der A—D-Kopplung
KIR1	GTGACAACTCGAGCACAGCTGCG	"
Hyg1	ATGTCCTGCGGGTAAATAGC	Nachweis & Sequenzierung der C—B-Kopplung
BarS	TACATCGAGACAAGCACGGT	"
I-Sce I-FW	GAACCTGGGTCGGAACCTC	Nachweis des I-SceI-ORFs
I-Sce I-RV	CAGGAAAGTTTCGGAGGAG	"
aacC1-n-FW	GTGCA <u>GGTACC</u> GGATCCTAGGGATAACAGGGTAATAGCTTGCCAACATGGTGG	Klonierung pMP1-n und pMP1-i
aacC1-n-RV	GTGCA <u>GGTACC</u> ATTACCCTGTTATCCCTAAATTCGGGGGATCTATAG	Klonierung pMP1-n
aacC1-i-RV	GTGCA <u>GGTACC</u> TAGGGATAACAGGGTAATAATTCGGGGGATCTATAG	Klonierung pMP1-i
M13-FW	GTA AACGACGGCCAGTG	Insert-Sequenzierung pBluescript SK+ und pGEM®-T
M13-Rev	CACAGGAAACAGCTATGAC	"
GENT S	ATGCGGGCTGCTCTTGATCT	Gentamycin-spezifische Sonde; Bestimmung der RB-Flanken (NHEJ-Linien)
GENT A	AGAGCCACTGCGGGATCGTC	Gentamycin-spezifische Sonde
GUS-FW7	CAATGGTGATGTCAGCGTTG	GUS-spezifische Sonde
GUS-Rev	GAAGTTCATGCCAGTCCAG	"
Site-Finder-1	CACGACACGCTACTCAACACACCACTCGCACAGCGTCTCTAAGCGGGCCGNNNNNGCCT	SiteFinder-PCR
SFP1	CACGACACGCTACTCAACAC	"
SFP2	ACTCAACACACCACTCGCACAGC	"
K4	CTTGGGTGGAGGGCTATTC	"
K7	CGAATATCATGGTGAAAATGG	"
UFW-TGIUS-LB1	GGACCGCTATCAGGACATAG	"
GUS23 FW2	CAGACTGAATGCCACAG	Amplifikation rekombinanter NHEJ-Verknüpfungen
GUS23 RV1	CATCGTTGAAGATGCCCTC	"
35S RV1	TCGACCTGCAGGCATGCCCGCTGAA	RB-spezifischer Primer (NHEJ-T-DNA)
NHEJ i-1 RB	CATGATTATTGTCTATACATATG	Bestimmung der RB-Flanke der NHEJ-Linie i-1
NHEJ i-2 RB	GCTTCAACCTCAAGCGTTAAC	Bestimmung der RB-Flanke der NHEJ-Linie i-2
NHEJ i-7 RB	GCTGCCGTTGTTGAATCGTTC	Bestimmung der RB-Flanke der NHEJ-Linie i-7

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin habe ich die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung vom 21. Dezember 2001 (bzw. 15. Januar 2002) beachtet.

Datum, Ort

Michael Pacher

Michael Pacher

geboren am: 15.12.1977 in Karlsruhe

Nationalität: deutsch

1984 – 1988 Südend-Grundschule in Karlsruhe

1988 – 1997 Goethe-Gymnasium in Karlsruhe

1997 Abitur am Goethe-Gymnasium in Karlsruhe

1997 – 1998 Zivildienst am Städtischen Krankenhaus Sindelfingen

1998 – 2004 Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TH)

2000 – 2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Botanischen Institut II

2004 Diplomarbeit am Botanischen Institut II
„Untersuchungen zur transkriptionellen Antwort von *Arabidopsis thaliana* auf genotoxischen Stress mittels Real-Time PCR“
unter Prof. Dr. H. Puchta

2004 – 2008 Doktorand am Botanischen Institut II, Lehrstuhl für
Molekularbiologie & Biochemie der Pflanzen, Universität
Karlsruhe (TH), unter Prof. Dr. H. Puchta