



Untersuchungen zur Gentechnologie und DNA-Reparatur in Pflanzen mithilfe der Cas9 Nickase

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von

M.Sc. Simon Schiml

aus

Heidelberg

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Holger Puchta

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: Schlussitzung am 12.02.2016

Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Publikationen bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Fauser, F., **Schiml, S.**, und Puchta, H. 2014. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 79(2): 348-359.

Schiml, S., Fauser, F. und Puchta, H. 2014. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J* 80(6): 1139-1150.

Steinert, J., **Schiml, S.**, Fauser, F. und Puchta, H. 2015. Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J* 84(6): 1295-1305.

Übersichtsartikel:

Schiml, S., Fauser, F. und Puchta, H. 2016. CRISPR/Cas-mediated site-specific mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using Cas9 nucleases and paired nickases. *Methods Mol Biol*, Ausgabe "Chromosome and Genomic Engineering in Plants". Zur Publikation akzeptiert.

Schiml, S. und Puchta, H. 2016. Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods*. Zur Publikation akzeptiert.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Doppelstrangbruchreparatur in Pflanzen	3
1.1.1 Nicht-homologe Endverknüpfung	4
1.1.2 Homologe Rekombination	5
1.2 Sequenzspezifische Induktion von Doppelstrangbrüchen	9
1.2.1 Meganukleasen	9
1.2.2 Zink-Finger Nukleasen	11
1.2.3 <i>Transcription activator-like effector</i> Nukleasen	12
1.2.4 Das CRISPR/Cas System	14
1.3 <i>Genome engineering</i> bei Pflanzen	17
1.4 Einsatz von CRISPR/Cas in Pflanzen	19
1.5 <i>Off-target</i> Aktivität von Cas9	21
1.6 Strategien zur Reduktion von <i>Off-target</i> Aktivitäten	22
1.7 Ziele dieser Arbeit	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Kits	28
2.1.3 Programme und Datenbanken	28
2.1.4 Chemikalien	29
2.1.5 Puffer	30
2.1.6 Medien	32
2.1.7 Plasmide	33
2.1.8 Organismen	34
2.2 Methoden	35
2.2.1 Transformation und Kultur von <i>E. coli</i>	35
2.2.2 Transformation und Kultur von <i>A. tumefaciens</i>	35
2.2.3 Aussaat, Anzucht und Transformation von <i>A.thaliana</i>	36
2.2.4 DNA Präparation aus Pflanzengewebe	37
2.2.5 Qualitativer und quantitativer Nachweis von β -Glucuronidase-Aktivität	38
2.2.6 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.7 Auswertung von NGS Daten	40
3 Ergebnisse	42
3.1 Konzeption und Herstellung von Vektoren zur Expression von Cas9	42
3.1.1 Klonierung eines <i>Gateway</i> -kompatiblen Vektorsystems	42
3.1.2 Klonierung von Cas9 Nickasen	43
3.1.3 Klonierung eines Vektorsystems zur Expression mehrerer sgRNAs	43
3.2 Analyse von Cas9-vermittelter Mutagenese	45
3.2.1 <i>Deep sequencing</i> von Nuklease-vermittelten NHEJ Ereignissen	45
3.2.2 <i>Deep sequencing</i> von Nickase-vermittelten NHEJ Ereignissen	47

Inhaltsverzeichnis

3.3	Analyse der Induktion von HR durch Cas9 Nukleasen und Nickasen	48
3.3.1	Vergleich von SSBs auf codogenem und nicht-codogenem DNA-Strang . . .	51
3.3.2	Vergleich der Aktivität der beiden Cas9 Nickasen D10A und H840A	54
3.4	Etablierung und Analyse von gepaarten Cas9 Nickasen zur zielgerichteten Mutagenese in Pflanzen	54
3.4.1	Nachweis hereditärer Mutationsereignisse als Folge gepaarter SSB Induktion	60
3.5	Systematische Analyse von Genomveränderungen als Folge gepaarter SSBs	62
3.5.1	Induktion von SSBs auf beiden DNA-Strängen	62
3.5.2	Induktion von SSBs auf dem selben DNA-Strang	68
4	Diskussion	73
4.1	Etablierung eines CRISPR/Cas Systems in <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
4.2	Analyse von NHEJ als Folge von DSBs und SSBs	75
4.3	Induktion von HR durch Cas9-vermittelte DSBs und SSBs	77
4.3.1	Vergleich von HR nach SSBs auf den verschiedenen DNA-Strängen	80
4.3.2	Analyse der Cas9 Nukleasedomänen	80
4.4	Analyse von NHEJ als Folge gepaarter SSBs	81
4.5	Genomveränderungen durch gepaarte SSBs	83
4.5.1	Betrachtung einzelner Ereignisse nach Induktion gepaarter SSBs	84
4.5.2	Ausblick	88
4.6	Ausblick auf Cas9 als Werkzeug der Grünen Biotechnologie	89
4.6.1	Rechtliche Situation für die Pflanzenzüchtung	91
5	Zusammenfassung	93
6	Summary	95
7	Literaturverzeichnis	96
8	Anhang	112
8.1	Plasmide	112
8.2	Primer	113
8.3	Rohdaten der quantitativen GUS-Messungen	115
8.4	Nachweis hereditärer Mutationen von gepaarten DNA-Einzelstrangbrüche (SSBs) .	116
8.5	NGS Daten der Analyse gepaarter SSBs	117
	Eidesstattliche Erklärung	XII

Abbildungsverzeichnis

1.1 Vereinfachte Darstellung der NHEJ Mechanismen	6
1.2 HR Mechanismen in somatischem Pflanzengewebe.	8
1.3 Schematischer Aufbau einer ZFN	13
1.4 Schematischer Aufbau einer TALEN	14
1.5 CRISPR-vermittelte Immunabwehr	16
1.6 Folgen eines induzierten DSB im Rahmen des <i>Genome engineering</i>	19
1.7 Schematische Darstellung von gepaarten Nickasen und dCas9-FokI Fusion	24
2.1 Klonierung einer sgRNA Expressionskassette	40
3.1 Übersicht über die eingesetzten Konstrukte	44
3.2 <i>Deep sequencing</i> Analyse der durch eine Cas9 Nuklease verursachten NHEJ Ereignisse.	46
3.3 Größenverteilung von durch Cas9 Nuklease verursachten Mutationen	47
3.4 <i>Deep sequencing</i> eines genomischen Locus nach SSB Induktion	48
3.5 Reporterkonstrukte, die für den Nachweis induzierter HR eingesetzt wurden	49
3.6 X-GlcA Färbung von DGU.US und IU.GUS Pflanzen mit Cas9 und Cas9-D10A Konstrukten	50
3.7 Quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität nach DSB- oder SSB-Induktion	52
3.8 Vergleich von HR nach SSB-Induktion auf den beiden DNA-Strängen	53
3.9 Vergleich der Effizienz der beiden Cas9 Nickasen D10A und H840A	55
3.10 <i>Deep sequencing</i> Analyse der durch gepaarte Cas9 Nickasen verursachten NHEJ Ereignisse.	57
3.11 Verteilung der Größen von Insertionen und Deletionen nach Induktion von NHEJ durch gepaarte Nickasen	58
3.12 NHEJ Ereignisse im reduzierten Datensatz der Induktion gepaarter SSBs	59
3.13 Beispiele erblicher Mutationen als Folge gepaarter SSBs	61
3.14 Auswahl von Loci und Planung von Zielsequenzen zur Analyse von gepaarten SSBs	63
3.15 <i>Deep sequencing</i> Analysen gepaarter SSBs in <i>ADH1</i>	65
3.16 <i>Deep sequencing</i> Analysen gepaarter SSBs im intergenischen Bereich	66
3.17 <i>Deep sequencing</i> Analysen gepaarter SSBs im Heterochromatin	67
3.18 Größen von Mutationen nach gepaarten SSBs auf beiden DNA-Strängen	68

Abbildungsverzeichnis

3.19	Insertionen für die Konstrukte ADH-o50 und ADH-o100	69
3.20	Deletionen für SSBs auf einem DNA-Strang in <i>ADHI</i>	70
3.21	<i>Alignment</i> der größten Insertionen nach gepaarten SSBs auf einem DNA-Strang . . .	72
4.1	Modell für die unterschiedlich starke Rate an HR als Folge von DSBs und SSBs . . .	78
4.2	Modelle für SSB induzierte HR in den Reporterkonstrukten	79
4.3	Ablauf für die Ausprägung einer Deletion durch Mikrohomologien	85
4.4	Modelle für die Ausbildung von Insertionen nach gepaarten SSBs	86
4.5	Veränderungen nach Induktion von SSBs auf einem DNA-Strang	87
8.1	Insertionen im intergenischen Bereich nach Induktion von SSBs auf beiden DNA- Strängen	118
8.2	Insertionen im Heterochromatin nach Induktion von SSBs auf beiden DNA-Strängen	119
8.3	Deletionen im intergenischen Bereich nach SSB Induktion auf einem DNA-Strang . .	120
8.4	Deletionen im Heterochromatin nach SSB Induktion auf einem DNA-Strang	120

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht der Zusätze für Medien	34
3.1	<i>Deep sequencing</i> Ergebnisse von gepaarten SSBs auf einem DNA-Strang	70
8.1	Liste aller verwendeten oder hergestellten Plasmide	112
8.2	Liste aller Primer	113
8.3	Rohdaten der Abbildung 3.7	115
8.4	Rohdaten der Abbildung 3.8	115
8.5	Rohdaten der Abbildung 3.9	115
8.6	Segregationsanalyse transgener T2 Linien	116
8.7	Übersicht über <i>Read</i> Anzahlen der Analyse gepaarter SSBs auf beiden DNA-Strängen	117

Abkürzungsverzeichnis

4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
att	<i>Attachment site</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
DBD	DNA-Bindedomäne
dCas9	<i>deadCas9</i> , katalytisch inaktive Variante von Cas9
D-loop	<i>Displacement loop</i>
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
GM	<i>Germination-Medium</i>
GT	<i>Gene targeting</i>
GUS	β -Glucuronidase
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
HR	Homologe Rekombination
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MID	<i>Multiplex identifier</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> , Kernlokalisationssequenz
NTS	Nicht-transkribierter DNA-Strang
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

PPT	Phosphinothricin
RNAi	RNA Interferenz
RVD	<i>Repeat-variable diresidue</i>
SDM	<i>Site-directed mutagenesis</i> , Ortsspezifische Mutagenese
SDSA	<i>Synthesis-dependent strand-annealing</i>
sgRNA	<i>Single-guide RNA</i>
SOC	<i>Super optimal catabolite repression broth</i>
SSA	<i>Single-strand annealing</i>
SSB	DNA-Einzelstrangbruch
TALEs	<i>Transcription activator-like</i> Effektoren
TALEN	<i>Transcription activator-like effector</i> Nuklease
T-DNA	Transfer DNA
TILLING	<i>Targeting induced local lesions in genomes</i>
tracrRNA	<i>Trans-activating crRNA</i>
WT	Wildtyp
YEB	<i>Yeast extract broth</i>
ZFN	Zink-Finger Nuklease

1 Einleitung

Die Grüne Biotechnologie, also die gezielte genetische Manipulation von Pflanzen, wurde in den 1980er Jahren mit der Herstellung der ersten transgenen Pflanzen begründet. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Infektion von Pflanzen durch das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* von Smith & Townsend (1907) beschrieben. Erst 40 Jahre später wurde durch Braun (1947) ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die Übertragung von DNA (sogenannte Transfer DNA, T-DNA) vom Bakterium auf das pflanzliche Gewebe involviert ist (Übersicht in Gelvin, 2003). Herrera-Estrella *et al.* gelang 1983 schließlich durch den Einsatz von *A. tumefaciens* die Integration eines artifiziiellen DNA-Abschnittes in ein pflanzliches Genom (Zellen von *Nicotiana tabacum*), und somit die erste Herstellung einer transgenen Pflanze. Bereits im darauffolgenden Jahr berichteten Paszkowski *et al.* (1984) über die Herstellung transgener Tabakprotoplasten durch die Aufnahme von Plasmid-DNA. Ende der 1980er Jahre kam durch die Entwicklung der biolistischen Transformation von Mais- und Tabakzellen eine dritte Methode zur Herstellung transgener Pflanzen hinzu (Klein *et al.*, 1988a,b).

Alle genannten Transformationsmethoden vereint das Problem, dass die Integration des Transgens nicht ortsspezifisch stattfindet. Das führt dazu, dass sich pflanzliche Gene nicht gezielt ausschalten oder modifizieren lassen. Eine Ausnahme bildet hier lediglich das Moos *Physcomitrella patens*, welches aus nach wie vor nicht komplett geklärten Gründen in somatischem Gewebe eine extrem hohe Rate an homologer Rekombination (HR) aufweist, und so gut für *Gene targeting* (GT) Experimente zugänglich ist (Übersichten in Schaefer, 2001; Cove, 2005). Als GT bezeichnet man im Allgemeinen die exakte, sequenzspezifische Integration eines fremden DNA Abschnittes in das Genom durch HR.

Um dennoch die Funktionen einzelner Gene untersuchen zu können, wurden vor allem zur Grundlagenforschung für die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, aber auch für landwirtschaftliche Nutzpflanzen große Kollektionen an Mutantenlinien erstellt. Von besonderer Bedeutung sind hier die T-DNA Insertionsmutanten, für die in großem Maßstab Agrobakterium-vermittelte Transformation mit anschließender Bestimmung des Integrationsortes der T-DNA durchgeführt wird (Alonso *et al.*, 2003). Wird die T-DNA innerhalb eines *Open reading frame* (ORF) integriert, so kommt es im Normalfall zur Verschiebung des Leserasters und damit zur Inaktivierung des entsprechenden Gens (*Knock-out*). Neben T-DNA können auch Transposons auf eine ähnliche Weise zur Erzeugung von

Einleitung

Knock-outs eingesetzt werden (Übersicht in Walbot, 1992). Auch die Behandlung mit chemischen oder physikalischen Genotoxinen zur Induktion von Punktmutationen sowie *Knock-outs* durch Verschiebung des Leserasters ist hier zu nennen. Alle Methoden haben gemeinsam, dass sich nicht vorher bestimmen lässt, wo die Veränderung des Genoms stattfindet, sodass die gewünschte Veränderung aufwändig aus einer Vielzahl an Pflanzen identifiziert werden muss.

Eine Methode, gezielt die Expression einzelner Gene zu unterdrücken, stellt die RNA Interferenz (RNAi) dar (Übersicht in Small, 2007). Durch die heterologe Expression von RNAs, welche komplementär zu Abschnitten des zu inaktivierenden Gen sind, bildet sich durch Hybridisierung an die mRNA doppelsträngige RNA aus, welche vor der Translation abgebaut wird. Dadurch kommt es nicht zur Bildung eines Proteins und das entsprechende Gen ist faktisch ausgeschaltet. Allerdings hat auch diese Methode klare Nachteile. Zum einen kommt es häufig zu *Off-target* Effekten, da die eingesetzten RNAs nicht immer spezifisch nur an eine mRNA binden (Xu *et al.*, 2006). Des Weiteren handelt es sich bei RNAi nicht um einen kompletten *Knock-out* des Zielgens, da es in geringem Maße immer noch zur Translation kommen kann. Man spricht daher im Zusammenhang mit RNAi häufig von einem *Knock-down* des Gens.

Den wichtigsten Schritt für die Grüne Biotechnologie seit der Etablierung der stabilen Transformation stellt die Entwicklung sequenzspezifischer Endonukleasen dar (Abschnitt 1.2; Übersichten in Voytas, 2013; Puchta & Fauser, 2014). Dabei handelt es sich um mehrere Gruppen von Enzymen unterschiedlicher Herkunft, die sich spezifisch auf eine Zielsequenz im Genom anpassen lassen und dort einen DNA-Doppelstrangbruch (DSB) einführen. Dieser DSB sorgt für die Aktivierung entsprechender Reparatur- oder Rekombinationsvorgänge, die zum Beispiel zur Ausbildung von Mutationen im Bereich des reparierten Abschnittes führen können, wodurch eine zielgerichtete Mutagenese möglich wird (siehe Abschnitt 1.1.1). Liegen identische Sequenzabschnitte (Homologien) vor, besteht die Möglichkeit einer HR basierten Reparatur, wodurch GT erreicht werden kann, und damit die spezifische Veränderung der Sequenz (siehe Abschnitt 1.3). Die eingesetzten Nukleasen waren zu Beginn Meganukleasen, deren Zielsequenz sich nur in einem sehr engen Rahmen verändern lässt. Durch die Fusion einer geeigneten DNA-Bindedomäne (DBD) an die Nukleasedomäne des Restriktionsenzym *FokI* standen zunächst mit den Zink-Finger Nukleasen (ZFNs) und später mit den *Transcription activator-like effector* Nukleasen (TALENs) Werkzeuge zur Verfügung, die sich tatsächlich an eine vorgegebene Zielsequenz anpassen lassen. Erst seit Mitte 2012 steht mit dem CRISPR/Cas System (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats; CRISPR-associated*

ted) das bisher vielversprechendste System zur Verfügung. Die Bindung an eine Zielsequenz wird dabei von einer kurzen RNA vermittelt, wodurch sich die Anpassung an neue Zielsequenzen sehr einfach und schnell durchführen lässt.

Teil dieser Arbeit ist die Etablierung und Charakterisierung eines geeigneten CRISPR/Cas Systems für den Einsatz in *A. thaliana*. Bei dieser Pflanzenspezies handelt es sich um ein Mitglied der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae), daher ist sie verwandt mit bedeutenden Kulturpflanzen wie etwa Raps (*Brassica napus*). Durch eine kurze Generationszeit von etwa 6 bis 8 Wochen, geringe Größe und einfache Kultur hat sich *A. thaliana* weltweit in der Grundlagenforschung als Modellpflanze etabliert. Das Genom umfasst etwa 125 Mbp, verteilt sich auf 5 Chromosomen und wurde bereits komplett sequenziert (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

1.1 Doppelstrangbruchreparatur in Pflanzen

Der DSB stellt für jeden Organismus den schwerwiegendsten genetischen Schaden dar, da dabei nicht die Möglichkeit besteht, den Schaden anhand eines noch intakten zweiten DNA Moleküls zu reparieren. Gleichzeitig sind DSBs jedoch vor allem während der Meiose Ausgangspunkt für die Rekombination und sind damit für die Variabilität der genetischen Information ausschlaggebend. Aus diesen Gründen haben sich im Laufe der Evolution zahlreiche Reparatur- und Rekombinationsprozesse entwickelt, die durch die Entstehung eines DSB aktiviert werden können (Übersicht in Jackson, 2002). Wie bereits erwähnt, stellen DSBs auch den Ausgangspunkt moderner biotechnologischer Methoden zur Genommanipulation dar, weswegen die relevanten Mechanismen im Bereich der pflanzlichen DSB Reparatur im Folgenden beschrieben werden.

Bei Pflanzen und den meisten anderen Eukaryoten lassen sich diese grundsätzlich in zwei Kategorien unterteilen (Übersichten in Bray & West, 2005; Puchta, 2005; Knoll *et al.*, 2014). Zum einen gibt es schnelle Mechanismen, bei denen die freien Enden des DSB durch Ligation miteinander verknüpft werden. Diese Mechanismen werden unter dem Begriff der nicht-homologen Rekombination zusammengefasst, da sie nicht auf der Anwesenheit von Homologien beruhen. Häufig sind diese Mechanismen jedoch fehleranfällig. Dem gegenüber stehen verschiedene Mechanismen der HR, die auf vorhandene Homologien zurückgreifen. Da diese Art der Reparatur meist fehlerfrei abläuft, spricht man hier auch von konservativer Rekombination.

1.1.1 Nicht-homologe Endverknüpfung

Den einfachsten Mechanismus zur Reparatur von DSBs stellt das *Non-homologous end joining* (NHEJ) dar. Dieser Weg ist sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten zu finden (Übersichten in Hefferin & Tomkinson, 2005; Burma *et al.*, 2006; Shuman & Glickman, 2007). In vielzelligen Eukaryoten wie Pflanzen ist NHEJ der Hauptmechanismus zur Reparatur von DSBs in somatischem Gewebe (Sargent *et al.*, 1997). Auch NHEJ selbst beschreibt nicht einen einzigen Mechanismus, sondern hier wurden bereits mindestens zwei unterschiedliche Reparaturwege identifiziert, die sich durch die beteiligten Proteine und den Ablauf der Reparatur unterscheiden (Übersicht in Mladenov & Iliakis, 2011). Bei den beiden charakterisierten Mechanismen handelt es sich zum einen um das klassische oder kanonische cNHEJ, zum anderen um das alternative aNHEJ (Abbildung 1.1).

Beim cNHEJ bindet zunächst das Heterodimer Ku, welches aus den beiden Untereinheiten KU70 und KU80 besteht, an die freien Enden des DSB, um diese vor nukleolytischem Abbau zu schützen (Feldmann *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2001). Darüber hinaus dient das gebundene Ku als Plattform für die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren. In Pflanzen sind die wichtigsten Faktoren der MRN-Komplex (MRE11, RAD50 und NBS1), der Exo- und Endonukleaseaktivität besitzt und für die Aufrechterhaltung der räumlichen Nähe der DNA-Enden verantwortlich ist (Rass *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2009; Amiard *et al.*, 2010), sowie das Heterodimer aus DNA-Ligase IV und XRCC4, das letztendlich die Ligation der DNA-Enden durchführt (West *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007). Zwar können die Enden beim cNHEJ prozessiert werden, was zu Deletionen oder durch das Einfangen freier DNA zu Insertionen führen kann, häufig kommt es aber zur Restauration der Originalsequenz.

Das aNHEJ läuft unabhängig von Ku und Ligase IV ab (Feldmann *et al.*, 2000). Häufig sind bei der Reparatur durch aNHEJ sehr kurze Abschnitte komplementärer Sequenzbereiche von wenigen bp Länge (sogenannte Mikrohomologien) involviert, weswegen dieser Weg auch als *Microhomology-mediated end joining* bezeichnet wird. Generell kommt es beim aNHEJ verstärkt zur Resektion der freien 5'-Enden des DSB, und damit zur Freilegung der Mikrohomologien. Finden sich auf den freigelegten DNA Einzelsträngen zueinander komplementäre Mikrohomologien, kann es zur Hybridisierung kommen. Die freien 3'-Enden werden durch den Komplex ERCC1-XPF1 abgebaut (Ahmad *et al.*, 2008) und schließlich die offenen Enden miteinander ligiert. Wichtige beteiligte Faktoren in diesem Reparaturmechanismus sind in Pflanzen PARP1 und XRCC1 (Masson *et al.*, 1998; Char-

bonnel *et al.*, 2010, 2011; Jia *et al.*, 2013). Die finale Ligation geschieht bei Vertebraten durch Ligase III (Audebert *et al.*, 2004), für die es allerdings kein pflanzliches Homolog gibt (Übersicht in Martin & MacNeill, 2002), sodass der exakte Ablauf in Pflanzen noch unklar ist. Durch die Resektion, die dadurch freiliegenden DNA Einzelstränge und deren Prozessierung kommt es bei diesem Mechanismus verstärkt zu Deletionen oder Insertionen.

In mehreren Organismen, darunter auch in Pflanzen, konnte gezeigt werden, dass die beiden NHEJ Reparaturwege in Konkurrenz zueinander stehen, indem aNHEJ durch Ku unterdrückt wird (Boulton & Jackson, 1996; Decottignies, 2007; Osakabe *et al.*, 2010). Somit wird allgemein angenommen, dass cNHEJ den bevorzugten Mechanismus darstellt und aNHEJ als Reserve zur Verfügung steht (Wang *et al.*, 2006). Für Pflanzen ist noch nicht endgültig klar, ob es unterschiedliche Präferenzen für einen der beiden Wege in verschiedenen Geweben oder Spezies gibt (Kirik *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2012). Darüber hinaus wird vermutet, dass es noch einen dritten Weg für NHEJ gibt, da auch Pflanzen, denen wichtige Faktoren sowohl für cNHEJ als auch für aNHEJ fehlen, weiterhin NHEJ Ereignisse aufweisen (Charbonnel *et al.*, 2011).

1.1.2 Homologe Rekombination

Die HR zur Prozessierung von DSBs spielt bei Pflanzen wie in den meisten anderen Eukaryoten vor allem während der Meiose eine große Rolle. Bei somatischem Pflanzengewebe tritt HR mit geringer Häufigkeit in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus auf (Übersicht in Puchta, 2005). Die grundsätzlichen Mechanismen der HR wurden zwar größtenteils in *Saccharomyces cerevisiae* erforscht, sind jedoch innerhalb der Eukaryoten stark konserviert (Übersichten in Haber *et al.*, 2004; Sung & Klein, 2006). Grundsätzlich basiert HR immer auf der Beteiligung eines homologen Sequenzabschnittes, dessen intakte Sequenzinformation als Matrize zur Reparatur des DSB dient. Dennoch unterteilt sich die HR ebenfalls in mehrere unterschiedliche Mechanismen, die sich im Ablauf und durch die beteiligten Enzyme unterscheiden. Weiterhin lassen sich die HR Mechanismen in konservative und nicht konservative HR unterteilen, abhängig davon, ob der reparierte DNA-Abschnitt der ursprünglichen Sequenz entspricht. Da sich die vorliegende Arbeit nicht mit meiotischen Prozessen beschäftigt, folgt eine Beschreibung der Mechanismen, die hauptsächlich in somatischem Gewebe von Bedeutung sind.

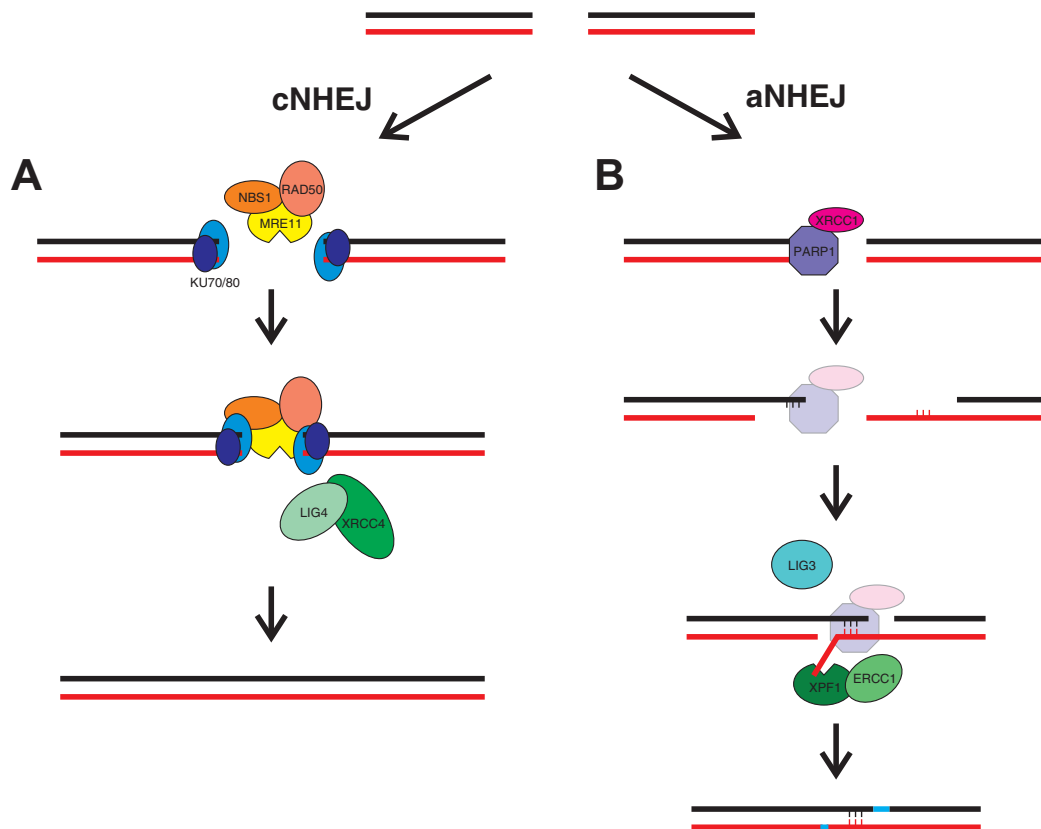


Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung der NHEJ Mechanismen. **A** cNHEJ. Die Prozessierung der Enden des DSB wird durch das Ku-Dimer unterbunden, der MRN-Komplex aus MRE11, RAD50 und NBS1 stabilisiert die zu reparierende Stelle und rekrutiert die weiteren Reparaturenzyme. Die Ligation der Enden erfolgt durch das Dimer aus LIG4 und XRCC4. **B** aNHEJ. Die DNA Stränge werden vom 3'-Ende ausgehend resektiert, sodass Mikrohomologien freigelegt werden. Diese hybridisieren und eventuell vorhandene Lücken oder freie Einzelstränge werden aufgefüllt beziehungsweise abgespalten, sodass es je nach Positionen der Strangbrüche und Mikrohomologien zu Insertionen oder Deletionen kommt.

1.1.2.1 *Single-strand annealing*

Das *Single-strand annealing* (SSA) stellt einen simplen und effektiven Weg dar, DSBs in somatischem Gewebe mittels HR zu reparieren (Lin *et al.*, 1984, Abbildung 1.2 A). Zwar ähnelt SSA vom Ablauf her stark aNHEJ, jedoch handelt es sich um zwei verschiedene Mechanismen, bei denen auch verschiedene Reparaturfaktoren involviert sind. Voraussetzung für SSA ist die Präsenz von längeren, sich wiederholenden Sequenzabschnitten. Findet zwischen zwei solcher Wiederholungen ein DSB statt, kommt es zunächst zur Resektion der 5'-Enden (Übersicht in Lyndaker & Alani, 2009). Die freien DNA-Einzelstränge werden durch Anlagerung des Einzelstrang-Bindeproteins RPA stabilisiert. Liegen auf beiden Strängen die repetitiven Sequenzen frei, so können diese hybridisieren. Dieser Vorgang wird vor allem durch RAD52 gefördert. Schließlich werden die überhängenden 3'-

Enden abgebaut, wofür in Hefe und wahrscheinlich auch in Pflanzen ein Dimer der Proteine RAD1 und RAD10 verantwortlich ist (Prado & Aguilera, 1995; Dubest *et al.*, 2002), und noch vorhandenen Lücken im DNA-Rückgrat werden geschlossen. Charakteristisch für SSA ist die Tatsache, dass dabei eine der beiden Sequenzwiederholungen sowie der Bereich zwischen den Wiederholungen verloren gehen (Abbildung 1.2 A). Aus diesem Grund wird SSA als ein Mechanismus nicht konservativer HR angesehen (Übersicht in Pfeiffer *et al.*, 2000).

Unter natürlichen Bedingungen spielt SSA vor allem in genomischen Bereichen mit zahlreichen Sequenzwiederholungen eine Rolle (Siebert & Puchta, 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass SSA auch stattfinden kann, wenn größere Abstände zwischen den Wiederholungen vorliegen, sodass es auch zur Deletion dieser Abschnitte kommt (Vaze *et al.*, 2002). Neben benachbarten Sequenzbereichen auf dem selben Chromosom kann die Rekombination auch zwischen verschiedenen Chromosomen ablaufen (Haber & Leung, 1996; Pacher *et al.*, 2007). Dadurch kann es zum reziproken Austausch von Chromosomenarmen kommen.

1.1.2.2 *Synthesis-dependent strand-annealing*

Der zweite wichtige Mechanismus für somatische HR in Pflanzen ist *Synthesis-dependent strand-annealing* (SDSA). Dem DSB folgt dabei zunächst wiederum die Resektion der 5'-Enden. Die dabei involvierten Proteine treten auch bei anderen HR Mechanismen auf, beispielsweise während der Meiose. Die initiale Resektion erfolgt durch den MRN-Komplex sowie durch die Exonuklease COM1 (pflanzliches Homolog zu Sae2 in Hefe und dem menschlichen CtIP; Uanschou *et al.*, 2007). Anschließend kommt es entweder zu einer weiteren Resektion durch die Exonuklease EXO1 oder durch eine Entwindung durch RecQ-Helikasen und die Abspaltung des freien Einzelstrangs durch die Endonuklease DNA2 (Zhu *et al.*, 2008). Dieser Ablauf ist nicht spezifisch für SDSA sondern tritt auch bei den hier nicht näher beschriebenen meiotischen Mechanismen von HR auf. Die freigelegten DNA-Einzelstränge werden durch RAD51 stabilisiert (Übersicht in Krejci *et al.*, 2012). Liegt ein homologer Sequenzabschnitt vor, so kann ein freier Einzelstrang in diesen Bereich invadieren und den dort vorhandenen Doppelstrang partiell auflösen. Die so entstandene Struktur wird als *Displacement loop* (D-loop) bezeichnet (Abbildung 1.2 B). In *A. thaliana* sind neben RAD51 auch XRCC3 und RAD54 in den Strangaustausch involviert (Roth *et al.*, 2012). Der invadierte Strang kann nun vom 3'-Ende ausgehend neu synthetisiert werden, dabei dient der aufgelöste, homologe Doppelstrang als Matrize. Mit Ende der Neusynthese wird der Einzelstrang wieder freigesetzt und

Einleitung

der D-loop wird aufgelöst. Der Einzelstrang kann wieder mit dem zweiten Einzelstrang auf der anderen Seite des DSB hybridisieren und durch Auffüllen der einzelsträngigen Bereiche und Ligation von Lücken wird die Stelle schließlich repariert.

Beim SDSA handelt es sich grundsätzlich um einen Mechanismus konservativer HR, da sich keine Deletionen im Verlauf der Reparatur ausbilden. Jedoch wird die Information des Sequenzbereiches übernommen, der zur Reparatur herangezogen wird. Wenn es sich dabei um einen homeologen Abschnitt handelt, ändert sich die Sequenzinformation des reparierten Bereiches entsprechend. Diesen Vorgang bezeichnet man als Genkonversion.

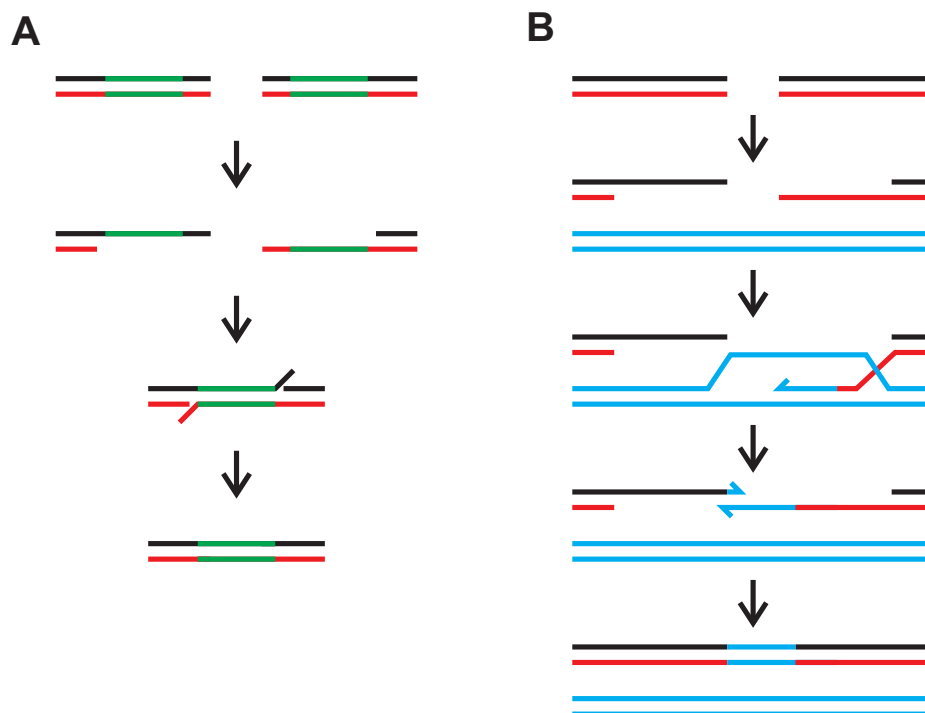


Abbildung 1.2: HR Mechanismen in somatischem Pflanzengewebe. **A** SSA. Ausgangspunkt ist ein DSB zwischen sich wiederholenden Sequenzbereichen (grün). Durch die Resektion der 5'-Enden werden die wiederholten Abschnitte freigelegt und können hybridisieren. Durch Prozessierung der freien 3'-Enden und Ligation des Rückgrates wird der DSB geschlossen. Dabei geht allerdings eine Wiederholung und die Information zwischen den Abschnitten verloren. **B** SDSA. Nach der Strangresektion invadiert ein freier DNA Einzelstrang in den homologen Bereich und bildet einen D-loop aus. Der invadierte Strang wird durch Neusynthese verlängert bis das Ende freigesetzt wird, um wieder mit dem ursprünglichen Strang zu hybridisieren. Die Reparatur wird durch weitere Neusynthese und dem Schließen der noch vorhandenen DNA-Einzelstrangbrüche (SSBs) abgeschlossen, allerdings wurde die Sequenzinformation des homologen Bereiches übernommen (blau).

Vor allem für SDSA, in geringerem Maße auch für SSA spielen neben den genannten Faktoren in A.

thaliana noch die Helikasen RECQ4A und FANCM sowie die Nuklease MUS81 eine Rolle (Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). Weiterhin konnte in Pflanzen gezeigt werden, dass SSA mit wesentlich größerer Frequenz auftritt als SDSA (Orel *et al.*, 2003).

Die möglichen homologen oder homeologen Bereiche, die für die Reparatur mittels SSA oder SDSA benutzt werden, können unterschiedlich lokalisiert sein. Neben der Lokalisation auf dem selben Chromatid kann auch das Schwesterchromatid oder das homologe Chromosom herangezogen werden (Kadyk & Hartwell, 1992; Palmer *et al.*, 2003). Seltener kommt es zur Rekombination mit ekto-pischen Sequenzen.

1.2 Sequenzspezifische Induktion von Doppelstrangbrüchen

Bereits in den 1990er Jahren konnte zunächst durch den Einsatz von Transposons in Mais gezeigt werden, dass sich die Rate an HR im pflanzlichen Genom durch die Präsenz eines DSB erhöht (Athma & Peterson, 1991). Kurz darauf konnte dies auch durch den Einsatz der sequenzspezifischen Nukleasen I-SceI in Tabak und HO in *A. thaliana* gezeigt werden (Puchta *et al.*, 1993; Chiurazzi *et al.*, 1996). Neben HR wird auch NHEJ durch die Induktion eines DSB induziert, was sich zur zielgerichteten Mutagenese im Pflanzengenom nutzen lässt (Salomon & Puchta, 1998, siehe Abschnitt 1.3). Außerdem konnte gezeigt werden, dass T-DNA mit höherer Wahrscheinlichkeit in DSBs integriert (Salomon & Puchta, 1998). Aus diesen Gründen entwickelte sich ein starkes Interesse an sequenzspezifischen Nukleasen, durch die sich die gezielte Induktion von DSBs ins Genom erreichen lässt. Im Folgenden werden die wichtigsten Klassen dieser Nukleasen näher beschrieben.

1.2.1 Meganukleasen

Bei Meganukleasen handelt es sich um Endonukleasen, die eine große Zielsequenz von 12-40 bp erkennen. Die am weitesten verbreitete und am besten untersuchte Klasse von Meganukleasen ist die LAGLIDAGD Familie, benannt nach einem konservierten Strukturmotiv, das die Nukleasefunktion vermittelt (Übersichten in Dujon, 1989; Stoddard, 2005). Als wichtigste Beispiele der LAGLIDAGD Meganukleasen können I-SceI aus der Bäckerhefe und I-CreI aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* genannt werden (Colleaux *et al.*, 1986; Dürrenberger & Rochaix, 1991). I-SceI ist

Einleitung

eine *Homing* Endonuklease, die im mitochondriellen Genom von *Saccharomyces cerevisiae* codiert ist (Dujon, 1980). Als *Homing* bezeichnet man dabei den Vorgang, mit dem sich das I-SceI-codierende Intron verbreitet, indem die Nuklease einen DSB in einem Allel ohne das Intron einführt. Bei der anschließenden Reparatur wird das intakte Allel mit dem Intron als Reparaturmatrize herangezogen, was zur Verbreitung des I-SceI ORF führt (Jacquier & Dujon, 1985; Dujon, 1989). I-SceI liegt monomerisch vor und hat eine 18 bp lange, nicht palindromische Erkennungssequenz (Colleaux *et al.*, 1988; Perrin *et al.*, 1993). Der erzeugte DSB weist 4 nt lange 3'-Überhänge auf. Im Gegensatz dazu ist I-CreI als Dimer aktiv und hat eine palindromische Erkennungssequenz von 22 bp Länge (Thompson *et al.*, 1992).

Für die Pflanzenforschung hat I-SceI besondere Bedeutung, da durch den Einsatz der Nuklease grundlegende Erkenntnisse zur DSB Reparatur gemacht werden konnten (Übersicht in Puchta, 2005). Die 18 bp lange Erkennungssequenz kommt statistisch in einem Genom sehr selten vor, in *Arabidopsis* und Tabak ist sie beispielsweise überhaupt nicht vorhanden. Die ersten *in vivo* Versuche mit I-SceI fanden in Protoplasten von *Nicotiana plumbaginifolia* statt (Puchta *et al.*, 1993). Dabei konnte gezeigt werden, dass ein durch I-SceI induzierter DSB auf einer co-transformierten Plasmid-DNA durch SSA repariert werden kann. Auch die Induktion von NHEJ durch Meganukleasen und die damit einhergehende zielgerichtete Mutagenese konnte in verschiedenen Pflanzen gezeigt werden (Salomon & Puchta, 1998; Kirik *et al.*, 2000). Dabei zeigte sich außerdem, dass T-DNA mit erhöhter Frequenz in einen induzierten DSB integrieren kann (Salomon & Puchta, 1998). Neben der gezielten Exzision einer transgenen Sequenz aus dem Genom (Siebert & Puchta, 2002) gelang auch der reziproke Austausch von genomischen Bereichen in Tabak durch I-SceI induzierte DSBs (Pacher *et al.*, 2007). Die Entwicklung effizienter GT Systeme basierte lange Zeit ebenfalls auf dem Einsatz von I-SceI (Puchta *et al.*, 1996; Chilton & Que, 2003; Tzfira *et al.*, 2003; Fauser *et al.*, 2012). Durch die Etablierung verschiedener Reporterkonstrukte, die unterschiedliche DNA-Reparaturwege anzeigen können (Swoboda *et al.*, 1994; Puchta *et al.*, 1995; Orel *et al.*, 2003; Molinier *et al.*, 2004; Wehrkamp-Richter *et al.*, 2009) gelang es außerdem, grundlegende Mechanismen der DNA-Reparatur und daran beteiligte Faktoren zu charakterisieren (Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012).

Um die Einsatzmöglichkeiten für Meganukleasen weiter zu erhöhen, wurde die DBD der Nukleasen angepasst, um veränderte Zielsequenzen erkennen und schneiden zu können. Dazu wurden die entsprechenden Aminosäuren sowohl zufällig als auch gezielt verändert, um eine Veränderung der Spezifität herbei zu führen (Chevalier *et al.*, 2002; Seligman *et al.*, 2002; Epinat *et al.*, 2003; Gimble

et al., 2003; Steuer *et al.*, 2004; Arnould *et al.*, 2006, 2007). Aufgrund der geringen Größe der Proteine ist eine klare Abgrenzung zwischen DBD und Nukleasedomäne zum Teil nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die meisten Studien zu veränderter Spezifität mit I-CreI durchgeführt, da es als Dimer agiert (Grizot *et al.*, 2011). I-CreI konnte in verschiedenen Ansätzen ebenfalls bereits erfolgreich für Genomveränderungen in Pflanzen eingesetzt werden (Gao *et al.*, 2010; Antunes *et al.*, 2012; D'Halluin *et al.*, 2013).

1.2.2 Zink-Finger Nukleasen

Zwar lässt sich die Spezifität von Meganukleasen für ihre Zielsequenz beeinflussen, doch der dafür zur Verfügung stehende Rahmen ist sehr begrenzt. Als erste Klasse von Nukleasen, die wirklich an eine gewünschte Zielsequenz angepasst werden konnte, wurden die ZFNs entwickelt. Die Architektur der ZFNs setzt sich im Wesentlichen aus zwei Komponenten zusammen (Übersicht in Durai *et al.*, 2005): Zum Einen wurde die DBD von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Zink-Finger Proteinen, übernommen (Übersicht in Wolfe *et al.*, 2000). Diese bestehen aus mehreren konservierten $\beta\beta\alpha$ -Strukturmotiven, den Zink-Fingern, bei denen zwischen Cysteinen und Histidinen ein Zn^{2+} Ion koordiniert ist. Die α -Helix eines Zink-Fingers ragt bei der Interaktion mit DNA in die große Furche der DNA und kann spezifisch ein Basentriplett erkennen (Pavletich & Pabo, 1991, Abbildung 1.3). Die DBD ist im Regelfall aus drei bis sechs Zink-Fingern aufgebaut und erkennt und bindet so hochspezifisch eine bestimmte DNA Sequenz. Die zweite Komponente, die eine ZFN ausmacht, ist die Nukleasedomäne des Typ IIS Restriktionsenzym *FokI* (Sugisaki & Kanazawa, 1981). Diese schneidet unspezifisch DNA, muss dazu aber dimerisieren (Bitinaite *et al.*, 1998; Wah *et al.*, 1998). Durch die Fusion der Zink-Finger DBD mit der *FokI* Domäne wurde 1996 die erste ZFN erzeugt (Kim *et al.*, 1996) und in den folgenden Jahren weiterentwickelt und die Funktionsweise gründlich analysiert (Smith *et al.*, 1999, 2000). Eine typische ZFN besteht aus zwei Monomeren, den sogenannten Armen (Abbildung 1.3). Die DBD jedes Arms besteht aus drei bis sechs Zink-Fingern, die gesamte Erkennungssequenz einer ZFN umfasst also 18-36 bp. Im 5-7 bp langen Bereich zwischen den beiden Zielsequenzen dimerisieren die Nukleasedomänen und induzieren den DSB (Smith *et al.*, 2000; Sander *et al.*, 2010). Durch den modularen Aufbau lassen sich ZFNs spezifisch für die gewünschte Zielsequenz bioinformatisch entwerfen (Segal *et al.*, 2003; Mader *et al.*, 2008, 2009).

Zur gezielten Genomveränderung konnten ZFNs seit ihrer Entwicklung bereits in zahlreichen Organismen eingesetzt werden. Als wichtige Beispiele können zielgerichtete Mutagenesen und GT Experimente in *Drosophila* (Bibikova *et al.*, 2002), *Caenorhabditis elegans* (Morton *et al.*, 2006), *Plasmodium falciparum* (Straimer *et al.*, 2012), Mäusen (Carbery *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2010) und humanen Zellen (Urnov *et al.*, 2005; Porteus & Baltimore, 2003) genannt werden. Auch in zahlreichen pflanzlichen Spezies gelang der Einsatz von ZFNs bereits. Zwar waren es anfangs noch transgene Tabak Zelllinien, in welche die ZFN Zielsequenz zuvor eingebracht wurde, dennoch waren damit sowohl zielgerichtete Mutagenese (Lloyd *et al.*, 2005) als auch GT möglich (Wright *et al.*, 2005). Die ersten Versuche mit ZFNs, die speziell für eine endogene Zielsequenz entworfen und erstellt wurden, folgten 2009 mit zwei Studien, bei denen natürliche Loci in Tabak und Mais mittels GT manipuliert wurden (Townsend *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2009). NHEJ vermittelte, zielgerichtete Mutagenese von natürlichen Genen wurden im darauffolgenden Jahr in *A. thaliana* erzielt (Osakabe *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Auch ZFN-vermitteltes GT wurde bereits für *A. thaliana* beschrieben (de Pater *et al.*, 2009). Neben den genannten Pflanzenarten wurden ZFNs unter anderem bereits erfolgreich in *Petunia hybrida*, Soja und *C. reinhardtii* eingesetzt (Marton *et al.*, 2010; Curtin *et al.*, 2011; Sizova *et al.*, 2013).

Obwohl sich ZFNs als die erste gezielt steuerbare synthetische Nuklease etabliert haben, ist ihr Einsatz nicht immer unproblematisch. So kann etwa die Spezifität gerade in Organismen mit großen Genomen verringert sein (Cornu *et al.*, 2008), darüber hinaus konnten auch bereits zytotoxische Effekte festgestellt werden (Szczeppek *et al.*, 2007; Cornu & Cathomen, 2010). Weiterhin ist die Klonierungsarbeit für eine neue Nuklease nicht unerheblich, dazu kommt die Tatsache, dass es zwischen den einzelnen Fingern der DBD zu Positions- und Interaktionseffekten kommen kann, sodass jede neue Nuklease zuerst auf ihre Aktivität und Spezifität getestet werden muss (Isalan *et al.*, 1997; Hurt *et al.*, 2003).

1.2.3 *Transcription activator-like effector* Nukleasen

Die Limitierungen von Meganukleasen und ZFNs bezüglich Flexibilität und Spezifität konnten erstmals durch die Entwicklung der TALENs überwunden werden. Der wichtigste Schritt dazu war die Entdeckung und Entschlüsselung der *Transcription activator-like* Effektoren (TALEs) (Übersicht

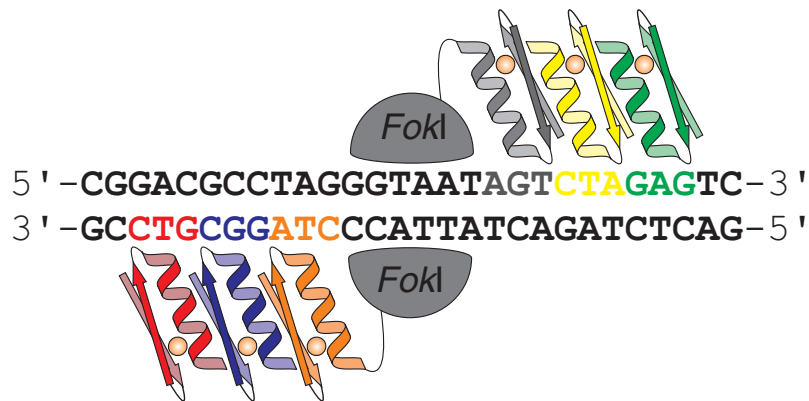


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau einer ZFN. Die Nuklease besteht aus zwei Armen, wobei jeder Arm aus der DBD und der Nukleasedomäne von *FokI* aufgebaut ist. Die DBD besteht aus 3-6 Zink-Fingern, von denen jeder 3 Nukleotide auf der DNA erkennen und binden kann. Durch Dimerisierung der Nukleasedomänen kommt es zum DSB im Bereich zwischen den Armen.

in Kay & Bonas, 2009). Diese wurden in pflanzenpathogenen Bakterien der Gattung *Xanthomonas* erstmals 1989 entdeckt und beschrieben (Bonas *et al.*, 1989). Kurz darauf wurde gezeigt, dass diese Proteine im Verlauf der Infektion die Virulenz des Bakteriums für die Pflanze beeinflussen (Herbers *et al.*, 1992). TALEs werden während der Infektion über ein Typ III-Sekretionssystem vom Bakterium in die Wirtszelle injiziert (Yang *et al.*, 2000). Über eine Kernlokalisationssequenz (NLS) gelangen sie in den Zellkern und binden dort an die DNA. Später wurde gezeigt, dass es sich bei TALEs um Transkriptionsfaktoren handelt, die das Transkriptom der Wirtszelle beeinflussen, um so die Infektion durch das Bakterium zu erleichtern (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Die Entschlüsselung des molekularen Mechanismus, durch den TALEs mit der DNA interagieren, gelang 2009 (Boch *et al.*, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). Die DBD besteht aus bis zu 30 konservierten Sequenzwiederholungen mit 33 bis 35 Aminosäuren (Kay *et al.*, 2005). Lediglich Position 12 und 13 jeder Wiederholung sind variabel und werden daher als *Repeat-variable diresidue* (RVD) bezeichnet. Bei der Interaktion mit der Wirts-DNA legt sich die DBD um die DNA, wobei das RVD jeder Wiederholung zur DNA zeigt (Deng *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2012). Jedes RVD ist dabei in der Lage, spezifisch ein Nukleotid der DNA zu erkennen und zu binden. Aufgrund der Tatsache, dass es dabei anders als bei ZFNs nicht zu einer Interaktion der Module untereinander kommt, kann durch Neukombination der Wiederholungen eine beliebige Sequenz als Ziel dienen (Boch *et al.*, 2009).

Zur Herstellung einer TALEN wurde die DBD wie bei den ZFNs mit der Nukleasedomäne von *FokI* fusioniert (Abbildung 1.4). Dadurch sind auch wieder zwei Arme der Nuklease nötig, damit die Nukleasedomänen dimerisieren können, wodurch der DSB zwischen den Bindestellen indu-

ziert wird. Der erfolgreiche Einsatz dieser chimären Nuklease gelang als erstes in Hefe (Christian *et al.*, 2010), kurz darauf folgte bereits die erste Veröffentlichung zur Anwendung in *N. benthamiana* (Mahfouz *et al.*, 2011). Zunächst war die Klonierung einer neuen Nuklease zwar aufwändig, doch binnen kurzer Zeit wurden einfache Protokolle entwickelt, um TALENs schnell und in großer Anzahl herstellen zu können (Cermak *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Reyon *et al.*, 2012; Schmid-Burgk *et al.*, 2013). Die Auswahl geeigneter Zielsequenzen lässt sich bioinformatisch automatisiert treffen (Doyle *et al.*, 2012).

Einige Pflanzenspezies, in denen TALENs bereits erfolgreich eingesetzt wurden, sind unter anderem *A. thaliana* (Qi *et al.*, 2013), Reis (Li *et al.*, 2012), Mais (Liang *et al.*, 2014), Weizen (Wang *et al.*, 2014), Tabak (Zhang *et al.*, 2013) und Soja (Haun *et al.*, 2014).

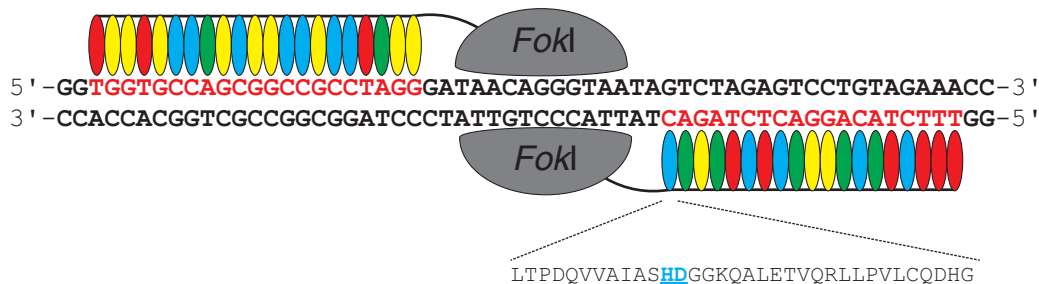


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau einer TALEN. Die Nuklease besteht ebenfalls aus zwei Armen, erneut bestehend aus DBD und *FokI* Nukleasedomäne. Die DBD ist aus 10-30 repetitiven Sequenzen aufgebaut, die sich an Position 12 und 13, dem sogenannten RVD, voneinander unterscheiden. Jedes RVD ist in der Lage, spezifisch ein Nukleotid auf der DNA zu erkennen und zu binden. Durch Dimerisierung der Nukleasedomänen wird zwischen den TALEN-Armen ein DSB induziert.

1.2.4 Das CRISPR/Cas System

Das jüngste, doch zugleich wichtigste System zur gezielten Induktion von DSBs ist das CRISPR/Cas System. Der Begriff CRISPR beschreibt dabei den Aufbau genomischer Loci zahlreicher Bakterien und Archeen, die bereits in den 1980er Jahren in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* entdeckt wurden (Stern *et al.*, 1984; Ishino *et al.*, 1987). Beschrieben wurde eine hoch konservierte, palindromische Sequenz von etwa 35 bp Länge, die in mehreren Kopien hintereinander im Genom zu finden ist, wobei nach jeder Wiederholung eine nicht konservierte Sequenz vergleichbarer Länge folgt, einem sogenannten *Spacer*. In unmittelbarer Nähe des CRISPR Locus liegen mehrere *Cas* Gene lokalisiert.

Einleitung

Mit der Entdeckung, dass die *Spacer* im CRISPR Locus von Viren oder fremden Plasmiden stammen, konnte die Rolle des CRISPR/Cas Systems als adaptives Immunsystem identifiziert werden (Bolotin *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006; Barrangou *et al.*, 2007, Abbildung 1.5 A). Abhängig von ihrer evolutionären Herkunft werden CRISPR/Cas Systeme in die Typen I-III unterteilt, die sich durch die beteiligten Cas Proteine sowie geringe Unterschiede im molekularen Ablauf unterscheiden (Übersichten in Makarova *et al.*, 2011; Wiedenheft *et al.*, 2012). Durch Jinek *et al.* (2012) konnte der molekulare Mechanismus des Typ II CRISPR/Cas Systems von *Streptococcus pyogenes* aufgeklärt werden, nach dem die CRISPR-vermittelte Immunabwehr abläuft (Übersicht in Sorek *et al.*, 2013). Der CRISPR Locus wird komplett als eine lange Vorläufer-RNA transkribiert, die anschließend im Bereich der palindromischen Sequenzwiederholungen von Cas Proteinen oder RNasen geschnitten werden, und so zu einzelnen CRISPR RNAs (crRNAs) werden, die jeweils aus dem *Spacer* sowie der palindromischen Sequenz bestehen, die eine *Hairpin* Struktur ausbildet (Deltcheva *et al.*, 2011). Diese crRNAs binden an weitere kurze RNAs, die sogenannte *Trans-activating* crRNA (tracrRNA) sowie an das Protein Cas9. Durch direkte Basenpaarung erkennt und bindet dieser Komplex die Zielsequenz auf der fremden DNA (Jinek *et al.*, 2012). Neben der eigentlichen Zielsequenz, die als *Protospacer* bezeichnet wird und im Fall von *S. pyogenes* 20 nt umfasst, ist noch eine kurze benachbarte Sequenz namens *Protospacer adjacent motif* (PAM) für die Erkennung nötig. Bei *S. pyogenes* lautet diese NGG und liegt 3' des *Protospacers*. Das PAM hat seine Bedeutung in der Unterscheidung zwischen eigener und fremder DNA, da es nur in der eindringenden DNA vorhanden ist, nicht aber im CRISPR Locus. Die gebundene Zielsequenz wird schließlich durch Cas9 inaktiviert. Cas9 trägt zwei Nukleasedomänen, eine N-terminale RuvC-Domäne und ein internes HNH-Motiv, durch die ein DSB induziert wird, wobei jede Domäne einen DNA Strang schneidet (Jinek *et al.*, 2012). Durch gezielte Punktmutationen in den Nukleasedomänen lässt sich Cas9 zu einer Nickase konvertieren, die SSBs erzeugt. Im Fall von Cas9 von *S. pyogenes* werden dazu Asp10 in der RuvC-Domäne beziehungsweise His840 im HNH-Motiv gegen Alanin ausgetauscht (Cas9-D10A oder Cas9-H840A). Die Aufnahme neuer *Spacer* geschieht bei allen drei CRISPR/Cas Typen durch die konservierten Proteine Cas1 und Cas2 (Yosef *et al.*, 2012; Nuñez *et al.*, 2014). Dabei werden PAMs in eindringender DNA erkannt und der daneben liegende Abschnitt wird unter Bildung einer weiteren Sequenzwiederholung am Beginn des CRISPR Locus eingebaut (Mojica *et al.*, 2009; Nuñez *et al.*, 2015).

Besonders interessant für die Anwendung des CRISPR/Cas Systems als programmierbare Nuklea-

Einleitung

se ist, dass sich crRNA und tracrRNA auch zu einer chimären *Single-guide* RNA (sgRNA) fusionieren lassen (Jinek *et al.*, 2012). Dadurch ergibt sich ein simples System aus zwei Komponenten, wobei das Protein Cas9 nie verändert werden muss und nur 20 nt der sgRNA die Spezifität der Nuklease bestimmen (Abbildung 1.5 B).

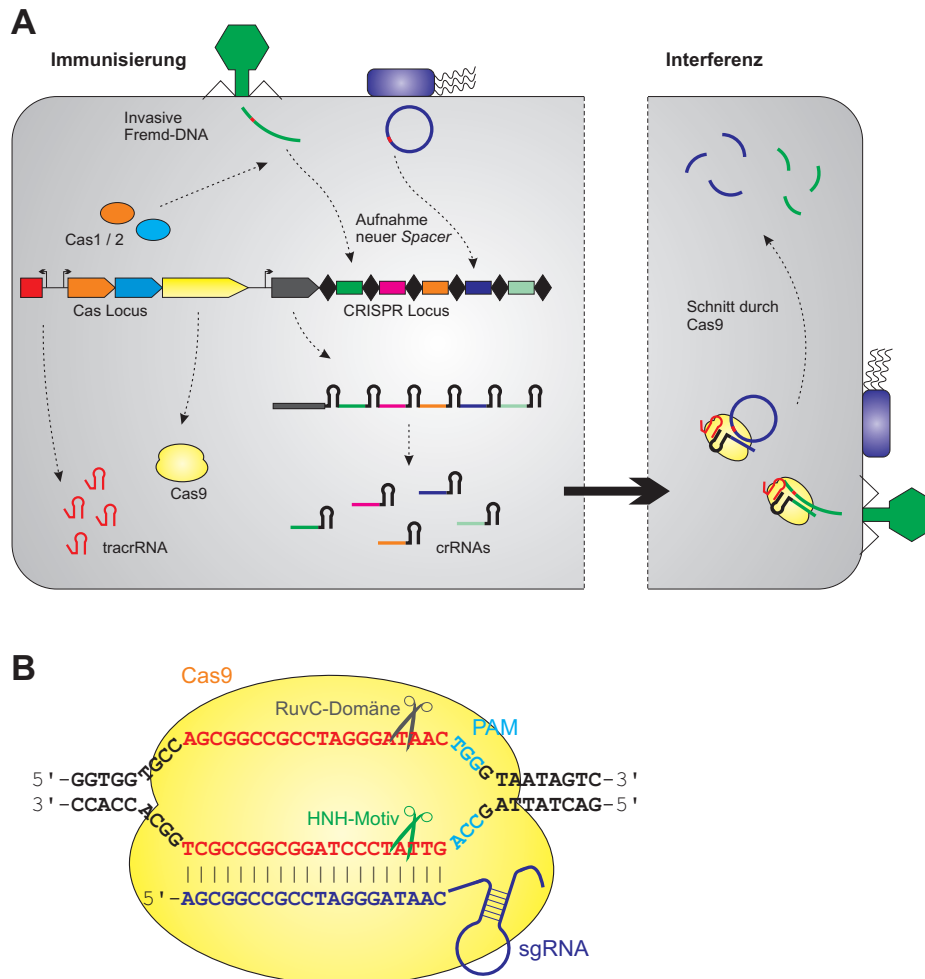


Abbildung 1.5: CRISPR-vermittelte Immunabwehr. A Ablauf der Immunantwort. Teile eindringender Fremd-DNA werden in den CRISPR Locus als neue *Spacer* aufgenommen (Immunisierung). Der CRISPR Locus wird als eine polycistronische RNA transkribiert und von RNasen zu den einzelnen crRNAs prozessiert. Zusammen mit tracrRNA und Cas9 wird die invasive Fremd-DNA gebunden und zerstört (Interferenz). **B** Molekularer Mechanismus der Cas9-vermittelten DSB-Induktion. Die sgRNA bindet an ihre komplementäre Sequenz neben dem PAM. Durch die beiden Nukleasedomänen von Cas9 werden die beiden DNA-Stränge 3 bp entfernt vom PAM geschnitten.

Anfang 2013 wurde parallel in zwei Studien gezeigt, dass sich das CRISPR/Cas System zur gezielten Induktion von DSBs in Humanzellen und damit in eukaryotischen Zellen anwenden lässt (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013b). Diese Veröffentlichungen stehen am Beginn einer ganzen Reihe von

weiteren Studien, durch die das Spektrum für CRISPR/Cas auf zahlreiche Organismen ausgeweitet wurde. Dieses umfasst bakterielle Systeme wie *E. coli* (Jiang *et al.*, 2013a), klassische Modellorganismen wie Hefe (DiCarlo *et al.*, 2013; Jacobs *et al.*, 2014), Trypanosomen (Peng *et al.*, 2015), *C. elegans* (Friedland *et al.*, 2013; Dickinson *et al.*, 2013) oder *Drosophila melanogaster* (Gratz *et al.*, 2013; Kondo & Ueda, 2013) sowie zahlreiche Vertebraten, darunter Zebrabärbling (Hwang *et al.*, 2013), Mäuse (Shen *et al.*, 2013), *Xenopus laevis* (Blitz *et al.*, 2013) und sogar Affen (Niu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Mitte 2013 gelang auch der erste Einsatz in Pflanzen (siehe Abschnitt 1.4). Kürzlich konnte sogar eine CRISPR vermittelte Immunabwehr menschlicher Zellen gegen HIV-1 erzielt werden (Liao *et al.*, 2015).

1.3 *Genome engineering* bei Pflanzen

Seit den Erkenntnissen Gregor Mendels über die Vererbung von Merkmalen basierte die Züchtung neuer Pflanzen auf der Kreuzung geeigneter Individuen und der phänotypischen Selektion der Nachkommen. Neue Merkmale können dabei jedoch nur durch spontan auftretende Mutationen entstehen, außerdem sorgt die Genkopplung dafür, dass bestimmte Merkmale nur gemeinsam vererbt werden können. Eine Methode um neue Merkmale zu erzeugen, stellt die Mutagenesezüchtung dar. Dabei werden Pflanzen gezielt chemischen oder physikalischen Genotoxinen ausgesetzt, zum Beispiel Ethylmethansulfonat oder γ -Strahlung, um Mutationen hervorzurufen. So wurde etwa in den 1960er Jahren im japanischen Ibaraki ein Feld in Betrieb genommen, bei dem Pflanzen mit γ -Strahlen aus einer ^{60}Co Quelle bestrahlt werden (Kawara, 1963). Bei dieser Strategie findet jedoch weiterhin immer nur eine phänotypische Selektion statt. Durch die Möglichkeiten, zunehmend molekularbiologische Analysen auch in großem Durchsatz durchführen zu können, rückte seit den 1990er Jahren auch die genotypische Analyse in den Fokus. Durch McCallum *et al.* wurde 2000 mit TILLING (*Targeting induced local lesions in genomes*) eine Methode vorgestellt, bei der mutagenisierte Pflanzen im Hochdurchsatz mittels HPLC auf die Präsenz einer Mutation in einem bestimmten Gen hin analysiert werden können.

Alle Methoden der Mutagenesezüchtung eint jedoch die Tatsache, dass nicht vorherbestimmt werden kann, welches Gen verändert wird. Diese Problematik löste sich durch die Entwicklung der sequenzspezifischen Nukleasen. Der erste erfolgreiche *in vivo* Einsatz der Meganuklease ISce-I in Tabakprotoplasten konnte zeigen, dass ein durch eine Nuklease erzeugter DSB die natürlichen Re-

paraturmechanismen aktiviert (Puchta *et al.*, 1993). Mit der Entwicklung der programmierbaren Nukleasen ZFNs und TALENs eröffnete sich die Möglichkeit der zielgerichteten Mutagenese in Pflanzen (Shukla *et al.*, 2009; Townsend *et al.*, 2009; Mahfouz *et al.*, 2011). Dazu wird eine Nuklease hergestellt, die einen DSB in dem Gen induzieren kann, welches mutagenisiert werden soll. Nach Transformation der Nuklease kommt es zur Ausbildung des entsprechenden DSB. In somatischem Pflanzengewebe wird dieser DSB bevorzugt durch NHEJ repariert, was zur Einführung kleiner Insertionen oder Deletionen führt (Abschnitt 1.1.1, Abbildung 1.6). Dadurch verschiebt sich das Leseraster im jeweiligen Gen, wodurch es im Normalfall zur Ausbildung eines verfrühten Stopp-Codons kommt. Dadurch ist die korrekte Translation des Gens gestört und es liegt ein *Knock-out* vor. Neben der einfachen Induktion von Mutationen innerhalb eines Gens konnte auch die komplette Eliminierung eines Sequenzabschnittes durch die Bildung von zwei benachbarten DSBs demonstriert werden (Siebert & Puchta, 2002). Darüber hinaus ist auch bekannt, dass T-DNA bevorzugt in vorhandene DSBs integriert, die sich im Verlauf der Transformation auch mit einer Nuklease künstlich erzeugen lassen (Salomon & Puchta, 1998).

Neben der einfachen NHEJ-vermittelten Mutagenese konnte bereits früh gezeigt werden, dass in Pflanzen prinzipiell auch GT möglich ist (Paszkowski *et al.*, 1988; Puchta *et al.*, 1993, 1996). Auch dabei bildet die Induktion eines DSB im gewünschten Locus den Ausgangspunkt, da dieser den Ablauf von HR ermöglicht. Über Sequenzbereiche von mehreren 100 bp Länge, die homolog zum Ziel-Locus sind, kann der vorgesehene Abschnitt so in den Ziel-Locus integriert werden. Da HR in somatischem Pflanzengewebe nicht der bevorzugte Reparaturmechanismus ist, sind die Frequenzen, mit denen GT auftritt, generell relativ gering (Übersicht in Puchta & Fauser, 2013).

Für die verschiedenen *Genome engineering* Ansätze konnte gezeigt werden, dass sie sich durch die Beeinflussung der natürlichen Reparaturenzyme manipulieren lassen. So lässt sich etwa beobachten, dass in *A. thaliana* größere Deletionen als Folge induzierter DSBs auftreten, wenn das Ku-Dimer oder LIG4 nicht vorhanden sind, und cNHEJ damit inaktiviert ist (Qi *et al.*, 2013). Auch eine erhöhte GT Frequenz wurde bei diesem Ansatz berichtet. Neben der Inaktivierung endogener Faktoren lassen sich die Reparaturmechanismen auch durch die heterologe Expression von Faktoren aus anderen Spezies beeinflussen. So brachte beispielweise die Expression von RAD54 aus Hefe in *A. thaliana* eine deutliche Erhöhung der GT Frequenz (Shaked *et al.*, 2005). In Bezug auf die Integration von T-DNA wurde festgestellt, dass das Ausschalten von NHEJ-assoziierten Faktoren die Transformationseffizienz verringert (Friesner & Britt, 2003; Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2012).

Einleitung

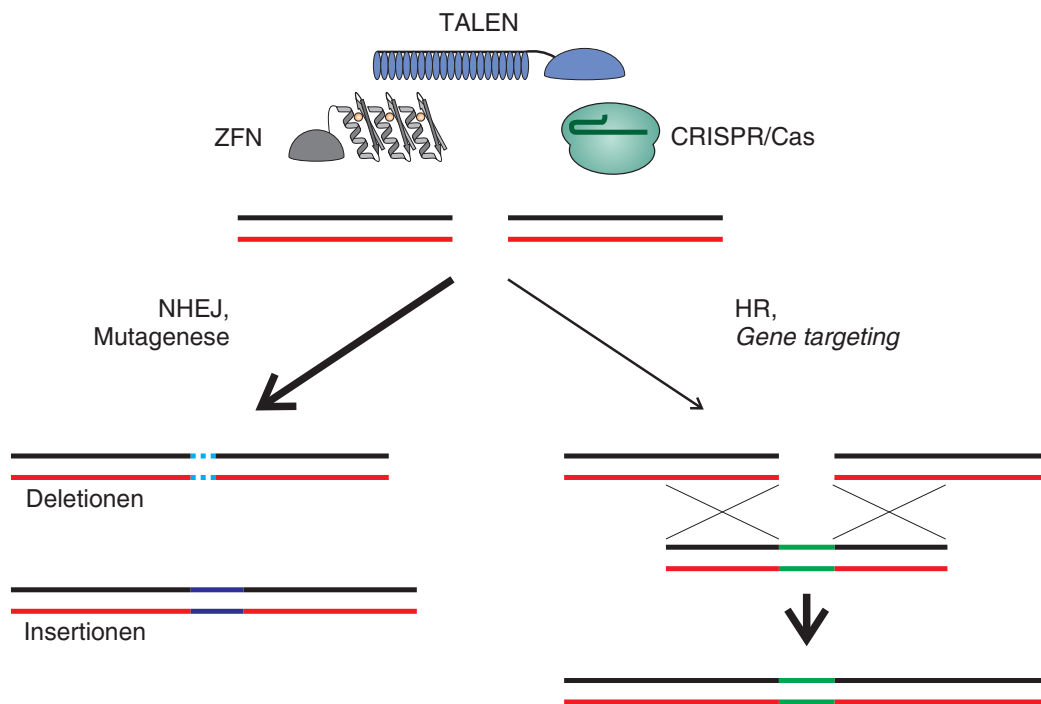


Abbildung 1.6: Folgen eines induzierten DSB im Rahmen des *Genome engineering*. Durch eine sequenzspezifische Nuklease wird ein DSB ins Genom eingeführt. Im einfachsten Fall wird dieser durch NHEJ repariert, was zur Ausbildung kleiner Deletionen oder Insertionen und damit zur Verschiebung des Leserasters führt. Diese zielgerichtete Mutagenese kann mit hoher Effizienz ablaufen. Liegt ein Sequenzabschnitt mit Homologien vor, kann es durch HR zu dessen Integration kommen (GT), was allerdings in Pflanzen nur mit geringer Frequenz erreicht werden kann.

1.4 Einsatz von CRISPR/Cas in Pflanzen

Mit dem CRISPR/Cas System wurde Mitte 2012 beziehungsweise Anfang 2013 eine Nuklease präsentiert, die extrem leicht anzuwenden und anzupassen ist, dabei jedoch sehr effizient ist (Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013b). Im August 2013 erschienen drei Studien in einer Ausgabe von *Nature Biotechnology*, die den ersten erfolgreichen Einsatz von Cas9 in Pflanzen berichteten. Shan *et al.* (2013) erreichten zielgerichtete Mutagenese in Protoplasten von Reis und Weizen mit Effizienzen von 15 % bis 38 %. Nach biolistischer Transformation der Nuklease wurden auch in Kallusgewebe von Reis mit einer Effizienz von 7 % bis 9 % Mutationen nachgewiesen. Dabei lagen auch biallelische Mutationen im *PDS*-Locus vor, durch die ein nachweisbarer Phänotyp vermittelt wurde. In Protoplasten von *A. thaliana* konnten durch Li *et al.* (2013) Mutagenesefrequenzen von bis zu 5 % beobachtet werden. In *Nicotiana benthamiana* lagen die Effizienzen deutlich höher bei knapp 40 %. Neben den Arbeiten an Protoplasten wurde auch Blattgewebe untersucht, wel-

Einleitung

ches mittels Agrobakterieninfiltration transient transformiert wurde. Dabei konnten Effizienzen von 2,7 % (*A.thaliana*) beziehungsweise 4,8 % (*N. benthamiana*) nachgewiesen werden. Nekrasov *et al.* (2013) untersuchten ebenfalls mit Agrobakterien infiltriertes Blattgewebe von *N. benthamiana*. Auch hier lag die Effizienz für die Mutagenese von *PDS* etwa bei 2 %. Die Regeneration von Pflanzen aus transformiertem Gewebe führte zu chimären Pflanzen, die neben dem wildtypischen Allel von *PDS* auch mutierte Sequenzen aufwiesen.

Diesen Studien folgten zahlreiche weitere, die den Einsatz von Cas9 auf andere Pflanzenspezies berichteten, darunter Tabak (Jiang *et al.*, 2013b), Mais (Liang *et al.*, 2014), Tomate (Brooks *et al.*, 2014), Soja (Jacobs *et al.*, 2015), Orange (Jia & Wang, 2014) und Pappel (Fan *et al.*, 2015). Es dauerte jedoch bis Anfang 2014, bis zum ersten mal die stabile Vererbung von Cas9 vermittelten Mutationen gezeigt werden konnte. Feng *et al.* (2014) konnten in stabil mit Cas9 Konstrukten transformierten *A. thaliana* Pflanzen NHEJ-vermittelte Mutagenese mit Frequenzen von bis zu 90 % feststellen. In der T2 und T3 Generation zeigten die Mutationen eine korrekte Segregation gemäß den Mendel'schen Regeln, was zeigt, dass es sich um stabil vererbte neue Allele handelte. Auch hier folgten zahlreiche weitere Studien, durch welche die Einsatzmöglichkeiten für Cas9 auf weitere Pflanzenarten oder durch unterschiedliche experimentelle Ansätze erweiterten. Davon sind besonders die ersten erbliche Mutagenesen in Reis, Tomate und Soja hervorzuheben (Zhang *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Für *A. thaliana* wurde kürzlich in zwei unabhängigen Studien gezeigt, dass sich auch gewebs- oder entwicklungspezifische Promotoren für die Kontrolle von Cas9 in Pflanzen einsetzen lassen (Hyun *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015), um so die Aktivität der Nuklease beispielsweise auf die frühe Entwicklung oder auf meristematische Zellen zu begrenzen. Durch HR vermitteltes GT gelang als Folge von durch Cas9 induzierte DSBs sowohl in *A. thaliana* als auch in Soja (Schiml *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Der Ansatz, Cas9 mit viralen Vektorsystemen zu verknüpfen, stellt ebenfalls eine interessante Weiterentwicklung dar. Beispielsweise wurden von der Arbeitsgruppe um Dan Voytas (Universität von Minnesota, USA) auf Geminiviren basierende Replikons als Vektor für Cas9 in *A. thaliana* eingesetzt (Baltes *et al.*, 2014); der Arbeitsgruppe von Magdy Mahfouz (König-Abdullah-Universität für Wissenschaft und Technologie, Saudi-Arabien) gelang durch den Einsatz von auf *Tobacco rattle virus* basierenden Konstrukten die effiziente, simultane Expression mehrerer verschiedener sgRNAs in *N. benthamiana* (Ali *et al.*, 2015). Die Anwendung von Cas9 Nickasen im pflanzlichen System zur Induktion von HR und NHEJ ist Teil dieser Arbeit (siehe Abschnitte 1.5 und 3; Fauser *et al.*, 2014; Schiml *et al.*, 2014).

1.5 *Off-target* Aktivität von Cas9

Eine Frage, die schon die ersten programmierbaren Nukleasen begleitet hat, ist die nach der Spezifität einer Nuklease (Übersicht in Kim & Kim, 2014). Besonders für therapeutische Anwendungen ist es wichtig zu wissen, ob eine Nuklease auch an anderen als der vorgesehenen Stelle DSBs verursacht (Übersicht in Cox *et al.*, 2015). Gerade für Cas9 ist immer noch nicht komplett geklärt, ob die im Fall von SpyCas9 23 bp lange Zielsequenz eine ausreichende Spezifität bietet. In grundlegenden *in vitro* und *in vivo* Studien wurde gezeigt, dass schon einzelne Basenaustausche in den 8 bis 12 bp am 3' Ende der Zielsequenz, der sogenannten *Seed Region*, die Erkennung des Ziels verhindern (Sapranaukas *et al.*, 2011; Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013). Allerdings gilt auch diese Regel nicht universell, besonders wenn eine hohe Konzentration von Cas9 und sgRNA vorliegen (Hsu *et al.*, 2013; Pattanayak *et al.*, 2013). Die tatsächliche *Off-target* Aktivität von Cas9 wurde bereits in verschiedenen biologischen Systemen mit unterschiedlichen Methoden untersucht (Übersicht in Koo *et al.*, 2015). Die einfachste Möglichkeit zur Untersuchung von *Off-target* Effekten besteht in der Analyse von alternativen Zielsequenzen mit hoher Homologie. Die Vorhersage von in Frage kommenden Stellen lässt sich bioinformatisch treffen (Bae *et al.*, 2014), die eigentliche Untersuchung erfolgt mittels Sanger- oder *Next generation* Sequenzierung (Cho *et al.*, 2014). Eine häufig eingesetzte Methode, bei der keine initiale Auswahl mögliche Zielsequenzen erfolgen muss, ist ChIP-Seq, also Chromatin Immunopräzipitation mit nachfolgender Sequenzierung. Dabei wird eine katalytisch inaktive Variante von Cas9 eingesetzt (sogannantes *deadCas9*, dCas9), bei der beide Nukleasedomänen durch Punktmutationen inaktiviert sind, sodass die Zielsequenz (und damit auch *Off-target* Ziele) weiterhin gebunden werden kann, aber kein DSB mehr induziert wird (Jinek *et al.*, 2012). Durch Immunopräzipitation mit einem entsprechenden Antikörper lassen sich so alle DNA Abschnitte finden und durch Sequenzierung identifizieren, die vom Cas9/sgRNA Komplex gebunden werden können (Kuscu *et al.*, 2014). Auch die komplette Resequenzierung von Genomen wurde durchgeführt, um Kenntnis über tatsächlich auftretende *Off-target* Aktivitäten zu bekommen (Smith *et al.*, 2014; Veres *et al.*, 2014). Weitere Methoden beinhalten unter anderem die Aufnahme von Oligonukleotiden in DSBs, die anschließend als Ausgangspunkt für eine gezielte Sequenzierung dienen (GUIDE-seq; Tsai *et al.*, 2015), oder die Markierung und folgende Anreicherung von Abschnitten mit DSB durch biotinylierte Oligonukleotide (Crosetto *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2015). Insgesamt muss hier angemerkt werden, dass die erhaltenen Ergebnisse abhängig von der

angewandten Methode und dem untersuchten Organismus variieren. Die meisten Studien zeigen keine oder nur sehr geringe *Off-target* Aktivitäten, mitunter werden jedoch auch sehr große Aktivitäten berichtet.

Für Pflanzen wurden bisher kaum Studien veröffentlicht, die sich gezielt mit dem Problem der *Off-target* Aktivitäten von Cas9 beschäftigen. Durch Sequenzierung von potentiellen *Off-target* Stellen konnten in *A. thaliana*, *N. benthamiana*, Weizen, Orange und Reis keine *Off-target* Effekte beobachtet werden (Li *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013; Upadhyay *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2014; Jia & Wang, 2014; Zhou *et al.*, 2014). Auch die komplette Genom Resequenzierung von *A. thaliana* blieb diesbezüglich ohne Ergebnis (Feng *et al.*, 2014). Jeweils eine Studie in Reis und Soja konnte geringe *Off-target* Aktivität von 1,6 % beziehungsweise bis zu 13 % an potentiellen *Off-target* Loci zeigen (Xie & Yang, 2013; Jacobs *et al.*, 2015). Die Arbeitsgruppe von Seiichi Toki (*National Institute of Agrobiological Sciences*, Japan) zeigte kürzlich, dass sich mehrere homologe Gene in Reis mit nur einer sgRNA simultan mutagenisieren lassen, indem die *Off-target* Aktivität von Cas9 ausgenutzt wurde (Endo *et al.*, 2015b). Dabei gelang die Mutagenese in einem von 4 homologen Loci nicht, bei dem ein Basenaustausch in der *Seed Region* des *Protospacers* vorlag.

1.6 Strategien zur Reduktion von *Off-target* Aktivitäten

Ähnlich wie für die Analyse von *Off-target* Aktivitäten von Cas9 existieren für Pflanzen kaum Studien, die sich mit deren Reduktion beschäftigen. Aus diesem Grund bezieht sich der folgende Abschnitt auf Experimente, die in Kulturen menschlicher, Zebrabärbling- oder Mauszellen durchgeführt wurden.

Die einfachste Variante zur Beeinflussung von *Off-target* Effekten liegt darin, bereits bei der Auswahl der Zielsequenz besonderes Augenmerk auf deren Qualität zu legen. Dazu existieren bereits zahlreiche Programme, welche die automatische oder manuelle Auswahl von geeigneten Zielsequenzen in einem vom Benutzer vorgegebenen Gen oder Sequenzabschnitt durchführen. Die Qualität der so gewählten Zielsequenzen für sgRNAs wird dabei bewertet, häufig nach den durch Doench *et al.* (2014) aufgestellten Kriterien. Bei den meisten Programmen wird schließlich noch in einem ausgewählten Genom nach potentiellen *Off-target* Stellen gesucht. Für Pflanzen ist die Menge an Programmen bisher noch begrenzt, zu nennen sind hier CRISPR-P (Lei *et al.*, 2014) und CCTop (Stemmer *et al.*, 2015).

Einleitung

Zur weiteren Optimierung der Spezifität sind grundlegende Modifikationen der beteiligten Komponenten nötig. Eine davon ist die Veränderung der sgRNA. In menschlichen Zellen konnte gezeigt werden, dass eine kürzere sgRNA eine erhöhte Spezifität aufweist, da sie sensitiver auf Abweichungen in der Zielsequenz reagiert (Fu *et al.*, 2014). Allerdings zeigte sich auch eine leicht reduzierte Aktivität der Nuklease. Die minimale Länge der Zielsequenz, bei der noch eine Nukleaseaktivität nachgewiesen werden konnte, lag bei 17 nt. Neben der Veränderung der sgRNA wurden auch bereits gezielte Veränderungen in Cas9 eingebracht, um die Spezifität des Enzyms zu modifizieren. So gelang es durch die Kombination bestimmter Punktmutationen, das von Cas9 erkannte PAM von NGG auf NGA oder NGC zu verändern (Kleinstiver *et al.*, 2015). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass beispielsweise durch einen D1135E Aminosäureaustausch die *Off-target* Aktivität der Nuklease verringert werden kann.

Eine wichtige Entwicklung zur Erhöhung der Spezifität stellt der Einsatz gepaarter Nickasen dar (Abbildung 1.7 A; Mali *et al.*, 2013a; Ran *et al.*, 2013). Durch den Einsatz von 2 sgRNAs zusammen mit der D10A Variante von Cas9 lassen sich 2 SSBs in die DNA einführen. Wenn sich die SSBs in unmittelbarer Nähe zueinander befinden und jeweils ein SSB auf jedem DNA-Strang liegt, resultiert dies in einem DSB mit langen, einzelsträngigen Überhängen. Dieser kann ebenso wie ein durch die Cas9 Nuklease erzeugter DSB durch NHEJ repariert werden, und führt so zur Ausbildung von Mutationen. Die Spezifität dieses Ansatzes ist gegenüber der Nuklease stark erhöht, da beide sgRNAs nah beieinander binden müssen, um zum DSB zu führen. In menschlichen Zellen und in Mausembrionen zeigte sich, dass auch bei einem Abstand von rund 100 bp noch Mutationen detektierbar waren, allerdings war die Mutagenesefrequenz deutlich höher, wenn ein DSB mit 5'-Überhängen vorlag als wenn es sich um 3'-Überhänge handelte (Mali *et al.*, 2013a; Ran *et al.*, 2013).

Eine ähnliche Strategie wie bei gepaarten Nickasen wird durch die *FokI* Fusion verfolgt (Abbildung 1.7 B). Dabei wurde die Nukleasedomäne von *FokI* an das katalytisch inaktive dCas9 Protein fusioniert (Guilinger *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2014). Das Resultat ähnelt der Situation von ZFNs oder TALENs, indem die DNA-Bindung spezifisch durch den Komplex aus sgRNA und dCas9 vermittelt wird, während die DSB Induktion durch die Dimerisierung von *FokI* erfolgt. Die Spezifität erhält dadurch eine weitere Ebene der Kontrolle, da neben der parallelen Bindung zweier Fusionsproteine auch deren Abstand zueinander für die korrekte Dimerisierung von *FokI* relevant ist (Bitinaite *et al.*, 1998). Kürzlich wurde dieser Ansatz mit der Verwendung kürzerer sgRNAs kombiniert, um die Spezifität noch weiter zu steigern (Wyvekens *et al.*, 2015).

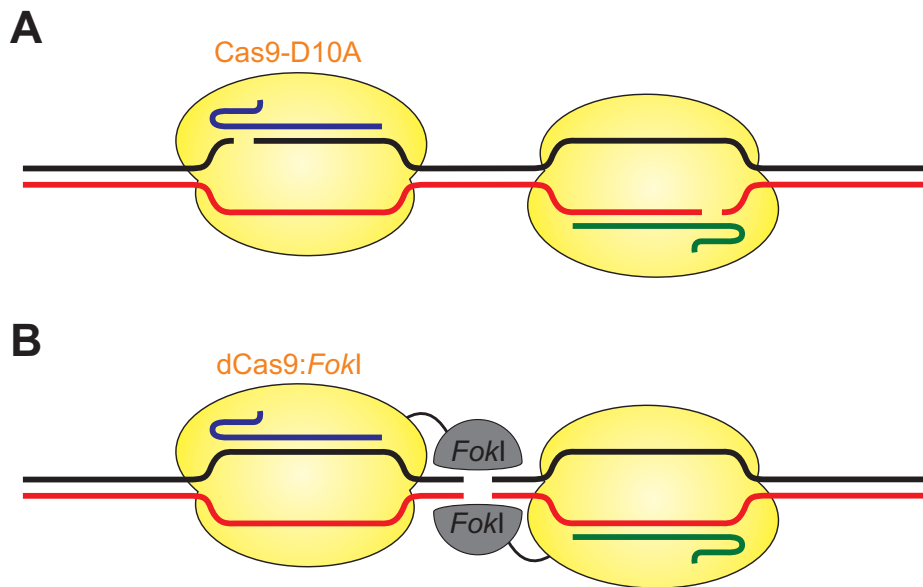


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung von gepaarten Nickasen und dCas9-FokI Fusion. **A** Gepaarte Cas9 Nickasen. Durch die D10A Mutation wird die RuvC-Domäne inaktiviert und es werden nur noch SSBs durch Cas9 induziert. Durch den Einsatz von zwei sgRNAs kann auf jedem DNA-Strang ein SSB eingefügt werden, was in einem DSB mit langen Einzelstrangüberhängen resultiert. **B** Durch Fusion der FokI Nukleasedomäne an katalytisch inaktives dCas9 wird erst durch den Einsatz zweier sgRNAs die Dimerisierung und DSB-Induktion ermöglicht.

1.7 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst CRISPR/Cas basierte, sequenzspezifische Nukleasen und Nickasen für den Einsatz in *A. thaliana* etabliert und analysiert werden. Dazu sollten Konstrukte kloniert werden, die eine einfache Spezifizierung von Cas9 Nukleasen und Nickasen ermöglichen. Mittels *Next generation sequencing* (NGS) basierendem *Amplicon deep sequencing* sollte untersucht werden, zu welchem Grad die Cas9 Nuklease und Nickase in der Lage sind, an einem endogenen Locus NHEJ, und damit zielgerichtete Mutagenese zu induzieren und welcher Art die entstandenen Mutationen sind. Durch Anwendung von Cas9 in zwei HR Reporterlinien von *A. thaliana* sollte darüber hinaus verglichen werden, in welchem Ausmaß Nuklease und Nickase in der Lage sind, HR zu induzieren. Dabei sollten beide Cas9 Nickasen (D10A ohne aktive RuvC Domäne und H840A ohne aktives HNH-Motiv) eingesetzt werden, um zu ermitteln, ob sich die Aktivitäten der beiden Nukleasedomänen unterscheiden.

Mit der so analysierten Cas9 Nickase sollte daraufhin der Ansatz gepaarter Cas9 Nickasen auf Pflanzen übertragen werden, bei dem die gemeinsame Induktion von zwei benachbarten SSBs auf

Einleitung

beiden DNA-Strängen zur Bildung eines DSB und damit zu NHEJ führen kann. Erneut sollte die genaue Analyse der resultierenden NHEJ Ereignisse mittels *Deep sequencing* erfolgen. Schließlich sollte überprüft werden, ob die so erhaltenen Mutationen vererbt werden können, um den experimentellen Ansatz biotechnologisch nutzbar zu machen.

Darüber hinaus sollte mit einer Untersuchung begonnen werden, welche Arten von genomischen Veränderungen durch die Reparatur gepaarter SSBs zustande kommen können, und wie diese entstehen. Dazu sollten in verschiedenen genetischen Bereichen SSBs in unterschiedlichen Abständen zueinander auf beiden oder auf dem selben DNA-Strang durch Cas9 induziert werden, und die verschiedenen Mutationsereignisse wiederum mittels *Deep sequencing* analysiert werden. Die Analyse der unterschiedlichen Ereignisse sollte Aufschluss über die möglichen Mechanismen der Entstehung und die evolutionäre Bedeutung solcher Veränderungen geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 Binokulare

- SZX-ILL-B2-220 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), mit Digitalkamera Color-View II und DF PLAPO 1xPF Objektiv

2.1.1.2 Geldokumentationssystem

- Gel iX Imager Geldokumentationssystem (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen)
- Peqlab Photodokumentationssystem (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

2.1.1.3 Heizblöcke, Schüttler, Trockenschränke, Inkubatoren

- Taumelschüttler 3011 (GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel)
- Inkubationsschüttler 3032 (GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel)
- Inkubationsschüttler Certomat® IS (B. Braun Biotech International, Melsungen)
- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg)
- Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg)
- Thermoblock TDB-120 (lab4you, Berlin)
- Thermostatic Water Bath WBS (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)
- Trockenschrank Modell BE-400 (Memmert, Schwabach)
- Trockenschrank Modell UE-500 (Memmert, Schwabach)

2.1.1.4 Sicherheitswerkbänke, Reinraumbänke

- captair® Biocap™ RNA/DNA (Erlab D.F.S. S.A.S., Köln)

Material und Methoden

- et130V Sicherheitswerkbank (Ehret GmbH und Co. KG, Emmendingen)
- NU-480-500E (NuAire, Plymouth, USA)
- Reinraumbank Typ HD (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genking)
- Reinraumbank Typ KVF (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genking)
- Uniflow UVU 700 (UniEquip, Planegg)

2.1.1.5 Thermocycler

- LightCycler 480 Real-Time PCR-System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Mastercycler® gradient (Eppendorf AG, Hamburg)
- MyCycler™ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Tpersonal (Biometra GmbH, Göttingen)

2.1.1.6 Waagen

- 440-47 Laborpräzisionswaage (Kern & Sohn, Balingen)
- AB104-s Feinwaage (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Analysenwaage LA-Serie (VWR International GmbH, Darmstadt)

2.1.1.7 Zentrifugen

- MiniSpin® (Eppendorf AG, Hamburg)
- PerfectSpin P (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Z 233 M-2 (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)
- Z 233 MK-2 (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)
- Z 383 K (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)

2.1.1.8 Sonstige Geräte

- Elektroporationsküvette, 2 mm Elektrodenabstand (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Elektroporator GenePulser II (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Material und Methoden

- EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer Technologies GmbH & Co. KG, Walluf)
- Laboklav (SHP Steriltechnik AG, Haldensleben)
- NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- PURELAB Classic Reinstwasseranlage (ELGA LabWater, Celle)
- Qubit® Fluorometer (Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- TKA high purity water system (Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert)

2.1.2 Kits

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- peqGOLD Cycle-Pure Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- peqGOLD Plasmid Miniprep Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- pGEM®-T Easy Vector System (Promega GmbH, Mannheim)
- Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt)

2.1.3 Programme und Datenbanken

- analySIS^B5.0 (Olympus Bio-Systems GmbH, Planegg)
- ApE - A plasmid Editor v2.0.46 (M. Wayne Davis, Salt Lake City, Utah, USA)
- CRISPResso 0.8.6 (Luca Pinello, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA)
- Integrative Genomics Viewer 2.3 (Robinson *et al.*, 2011; Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013)
- NCBI - National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov; letzter Zugriff am 25.11.2015)
- Poly Peak Parser (Hill *et al.*, 2014)
- Roche LightCycler® 480 Software Release 1.5.1.62 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- TAIR - The Arabidopsis Information Resource (www.arabidopsis.org; letzter Zugriff am 2.12.2015)
- The Galaxy Project (www.galaxyproject.org; Giardine *et al.*, 2005; Blankenberg *et al.*, 2010; Goecks *et al.*, 2010; letzter Zugriff am 21.12.2015)

2.1.4 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Feinchemikalien von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Niederlande), Merck KGaA (Darmstadt), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen bei München) sowie VWR International LLC (West Chester, PA, USA) in *p.a.* Qualität bezogen.

2.1.4.1 Sonderchemikalien

- 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG)
- Acetosyringon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München)
- Agarose SeaKem® LE (Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz)
- Beef-Extrakt (GERBU Biotechnik GmbH, Wieblingen)
- Benzylaminopurin (BAP; Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- dNTP-Gemisch, 10 mM je dNTP (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte oder Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- GeneRuler™ Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Hefe-Extrakt (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- IPTG (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Murashige & Skoog Fertigmedium (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Pepton (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Plant Agar (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Silwet Gold (Hermann Meyer KG, Rellingen)
- Trypton (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Tween-20 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- X-Gal (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- X-GlcA (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)

2.1.4.2 Enzyme

- Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- DreamTaq™ Polymerase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix (Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- Quick Ligation Kit (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- Ribonuklease A (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

2.1.4.3 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in Tabelle 8.2 aufgeführt. Oligonukleotide wurden entsalzt von Life Technologies GmbH (Darmstadt) oder Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) bezogen. HPLC-aufgereinigte Oligonukleotide wurden von biomers.net GmbH (Ulm) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden Oligonukleotide in einer Konzentration von 50 μ M eingesetzt.

2.1.5 Puffer

SB-Puffer für Agarose-Gele (20x)

8 g/l	NaOH
47 g/l	Borsäure
	pH 8
0,9 % oder 2 %	Agarose

TAE-Puffer für Agarose-Gele (50x)

242 g/l	Tris
57,1 ml/l	Eisessig
100 ml/l	0,5 M EDTA
	pH 8 mit Essigsäure
0,9 %	Agarose

Ladepuffer (6x)

0,2 %	Orange G
0,05 %	Xylencyanol
10 %	Glycerin
60 mM	EDTA

Ladepuffer für Kristallviolett-Gele (6x)

30 %	Glycerin
0,02 mM	EDTA
0,1 mg/ml	Kristallviolett

DNA-Extraktionspuffer

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

Nuclei-Lysispuffer

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

5 % Sarkosyllösung

50 g/l	N-Lauroylsarcosin
--------	-------------------

Isolierungspuffer (10 ml)

80 mg	Natriumdisulfit in 800 μ l ddH ₂ O
4,2 ml	DNA-Extraktionspuffer
4,2 ml	Nuclei-Lysispuffer
800 μ l	5 % Sarkosyllösung

Shorty-Extraktionspuffer

200 mM	Tris-HCl, pH 9
200 mM	LiCl
25 mM	EDTA
1 %	SDS

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA

4-MUG-Reaktionspuffer

50 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
10 mM	EDTA
0,1 %	SDS
0,1 %	Triton X-100
1 mM	4-MUG

2.1.6 Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurde sämtliche Medien in ddH₂O gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes wurden die Medien bei 121 °C und 2 atm für 20 min autoklaviert. Zusätze wie Antibiotika wurden nach Abkühlung auf unter 50 °C steril zugegeben. Tab. 2.1 listet die verwendeten Zusätze und deren eingesetzte Konzentrationen auf.

***Lysogeny broth* (LB)**

10 g/l	Pepton
5 g/l	Hefe-Extrakt
10 g/l	NaCl
pH 7	mit NaOH
17,5 g/l	Plant Agar (für Festmedien)

Germination-Medium (GM)

4,9 g/l	Murashige & Skoog
10 g/l	Saccharose
pH 5,7	mit KOH
8 g/l	Plant Agar (für Festmedien)

Infiltrationsmedium (unsteril angesetzt)

1,6 g/l	Murashige & Skoog
32 g/l	Saccharose
pH 5,7	mit KOH
4,25 µg/l	Benzylaminopurin
0,1 g/l	Acetosyringon
500 µl/l	Silwet

Super optimal catabolite repression broth (SOC)

5 g/l	Hefe-Extrakt
20 g/l	Trypton
0,6 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
2 g/l	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
2,5 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
3,6 g/l	Glucose

Yeast extract broth (YEB)

5 g/l	Beef-Extrakt
5 g/l	Pepton
1 g/l	Hefe-Extrakt
5 g/l	Saccharose
493 mg/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
12 g/l	Plant Agar (für Festmedien)

2.1.7 Plasmide

Sämtliche in dieser Arbeit eingesetzten oder klonierten Plasmide sind im Anhang in Tabelle 8.1 aufgeführt. Pflanzliche Expressionsvektoren basieren auf Vektoren der pPZP Familie (Hajdukiewicz et al., 1998).

Material und Methoden

Tabelle 2.1: Übersicht der Zusätze für Medien. Angegeben sind die finalen Konzentrationen in den jeweiligen Medien. LM = Lösungsmittel für die Stocklösung.

Zusatz	LM	Stocklösung	LB	YEB	GM
Ampicillin	H ₂ O	100 mg/ml	100 mg/l		
Cefotaxim	H ₂ O	250 mg/ml			500 mg/l
Gentamycin	H ₂ O	100 mg/ml	20 mg/l	20 mg/l	75 mg/l
Hygromycin	H ₂ O	50 mg/ml			10 mg/l
IPTG	H ₂ O	25 mg/ml	25 mg/l		
Kanamycin	H ₂ O	100 mg/ml	100 mg/l		30 mg/l
Phosphinothricin (PPT)	H ₂ O	20 mg/ml			7 mg/l
Rifampicin	DMSO	100 mg/ml		100 mg/l	
Spectinomycin	H ₂ O	100 mg/ml	100 mg/l	100 mg/l	
X-Gal	DMF	25 mg/ml	25 mg/l		

wicz *et al.*, 1994); standarmäßig kam dabei pSBO-2 zum Einsatz, wobei es sich wiederum um ein Derivat von pPZP201 handelt (Fauser *et al.*, 2014).

2.1.8 Organismen

- ***Escherichia coli*:** Sämtliche Plasmide wurden im Stamm NEB5 α (New England Biolabs, Frankfurt am Main) vermehrt. Ausnahme bilden Plasmide mit *ccdB*-Gen, diese wurden in DB3.1 (Bernard & Couturier, 1992) vermehrt.
- ***Agrobacterium tumefaciens*:** Zur stabilen Transformation von *A. thaliana* wurde der Stamm GV3101 (pMP90) (Holsters *et al.*, 1980; Koncz *et al.*, 1984) eingesetzt.
- ***Arabidopsis thaliana*:** In dieser Arbeit wurden wildtypische Pflanzen des Ökotypen Col-0 benutzt. Außerdem wurden die beiden stabil transformierten Linien DGU.US und IU.GUS (Orel *et al.*, 2003) eingesetzt, die ebenfalls einen Col-0 Hintergrund besitzen.

2.2 Methoden

2.2.1 Transformation und Kultur von *E. coli*

Durch die Calciumchlorid-Methode hergestellte, hitzekompetente *E. coli* Zellen wurden bei -80 °C gelagert und vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Der zu transformierende Ansatz wurde mit 100 μ l Bakterienzellen gemischt und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s, danach wurde der Ansatz direkt für weitere 2 min auf Eis abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 500 μ l LB oder SOC Flüssigmedium mit abschließender Inkubation bei 37 °C und 600 UPM für 1 h. 100 μ l des Transformationsansatzes wurden auf LB Festmedium mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die weitere Kultur wurde flüssiges LB Selektionsmedium mit einer Kolonie angeimpft und erneut über Nacht bei 37 °C und 200 UPM inkubiert. Plasmidisolierungen erfolgten mit 5 ml der Flüssigkultur und dem peqGold Plasmid Miniprep Kit gemäß den Herstellerangaben. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 μ l ddH₂O.

2.2.2 Transformation und Kultur von *A. tumefaciens*

Elektrokompetente Zellen wurden bei -80 °C gelagert und bei Bedarf schonend auf Eis aufgetaut. Zu 100 μ l Zellen wurde 1 μ l zu transformierende Plasmid-DNA gegeben und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten pipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 mF und 200 Ω für 5 s. Die Küvette wurde anschließend auf Eis gestellt und 500 μ l YEB Flüssigmedium zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 28 °C und 600 UPM für 1 h, anschließend wurden 100 μ l des Ansatzes auf YEB Festmedium mit entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert. Für die Transformation von *A. thaliana* wurden 20-40 ml YEB Flüssigmedium mit Selektionsmarkern mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 28 °C und 200 UPM inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 400 μ l entnommen, 400 ml Hauptkultur damit angeimpft und erneut über Nacht inkubiert. Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden 10 ml Vor- oder Hauptkultur eingesetzt und mit dem peqGold Plasmid Miniprep Kit gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Lyse der Zellen erfolgte dabei durch Zugabe von 50 μ l einer 10 mg/ml Lysozymlösung in ddH₂O (Sambrook & Russell, 2001) mit anschließender Inkubation für 5 min bei Raumtempera-

Material und Methoden

tur. Die Elution erfolgte mit 30 μ l ddH₂O.

Glycerin-Erhaltungskulturen von *E. coli* und *A. tumefaciens* wurden durch Mischung von 700 μ l Kultur mit 300 μ l sterilem Glycerin hergestellt und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Aussaat, Anzucht und Transformation von *A.thaliana*

Saatgut von *A. thaliana* wurde trocken, dunkel und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.3.1 Axenische Anzucht von Pflanzen

Saatgut wurde für 8-12 min in einer 4 % Natriumhypochloritlösung, versetzt mit einem Tropfen Tween-20 (Polysorbat-20), geschüttelt. Daraufhin wurde kurz bei 3.000 g zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Es folgten steril 2-3 Waschschriffe mit ddH₂O. Vor der Aussaat wurde das oberflächensterilisierte Saatgut für mehrere Stunden (meist über Nacht) bei 4 °C stratifiziert. Die Aussaat erfolgte unter sterilen Bedingungen auf GM Festmedium, je nach Anwendung mit entsprechendem Selektionsmarker. Im Fall von T1 Saatgut wurde Cefotaxim zugegeben, um das Wachstum von *A. tumefaciens* zu verhindern. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte bei 24 °C mit 16 h Licht- und 8 h Dunkelphase.

2.2.3.2 Erdanzucht von *A. thaliana*

Die Anzucht in Erde erfolgte unter unsterilen Bedingungen im S1 Gewächshaus des Botanischen Gartens. Das verwendete Erds substrat besteht aus einem 1:1 Gemisch aus Floraton3 (Floragard Vertriebs GmbH, Oldenburg) und Vermiculit (2-3 mm Körnung, Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH). Saatgut wurde über Nacht in Wasser bei 4 °C stratifiziert und anschließend ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei etwa 22 °C, relativer Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und 16-stündiger Lichtphase.

2.2.3.3 Stabile Agrobakterien-vermittelte Transformation

Die stabile genetische Transformation erfolgte durch die *Floral dip* Methode nach Clough & Bent (1998). Eine Hauptkultur von *A. tumefaciens* wurde 15 min bei 6.000 g zentrifugiert und das Pellet in 800 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Von drei bis fünf Wochen alten Pflanzen wurden

bereits gewachsene Schoten und geöffnete Blüten entfernt. Die Pflanzen wurden etwa 30 s bis zu den Rosettenblättern in die Suspension eingetaucht und daraufhin in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Schale dunkel über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden sie mit Wasser abgesprüht und bis zur Samenreife im Gewächshaus aufgestellt.

2.2.4 DNA Präparation aus Pflanzengewebe

2.2.4.1 DNA Schnellpräparation

Ein Rosettenblatt einer etwa zwei Wochen alten Pflanze wurde gemörsert und 500 μ l *Shorty*-Extraktionspuffer zugegeben. Anschließend wurde für 5 min bei 12.100 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 300 μ l zu 300 μ l Isopropanol pipettiert und durch invertieren gemischt, um die DNA zu fällen. Daraufhin wurde erneut für 10 min bei 13.500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wurde für 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Zugabe von 100 μ l TE-Puffer wurde die DNA gelöst, bei -20 °C oder Raumtemperatur gelagert und stand so für Routineversuche wie Genotypisierungen zur Verfügung.

2.2.4.2 Qualitativ und quantitativ optimierte DNA Isolation

Die Isolierung größerer Mengen reiner DNA für *Next Generation Sequencing* Analysen erfolgte gemäß Salomon & Puchta (1998). 30 etwa zwei Wochen alte Pflanzen wurden mit einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zermahlen, mit 5 ml Isolierungspuffer versetzt und gründlich durchmischt. Es folgte 1 h Inkubation bei 65 °C und anschließend wurden 5 ml Chloroform zugegeben, um Proteine abzutrennen. Zur Trennung der Phasen wurde für 15 min bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und 100 μ l RNase hinzugegeben. Es wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch die Zugabe von 5 ml Isopropanol (-80 °C) und vorsichtiges Invertieren gefällt. Erneut wurde für 10 min bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 2 ml Ethanol wurde das Pellet gewaschen und wiederum für 10 min bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und in 225 μ l TE-Puffer bei 37 °C gelöst. Die Lagerung fand bei -20 °C statt.

2.2.5 Qualitativer und quantitativer Nachweis von β -Glucuronidase-Aktivität

Der qualitative Nachweis der Aktivität von β -Glucuronidase (GUS) in pflanzlichem Gewebe erfolgte durch histochemische Färbung gemäß Orel *et al.* (2003). Etwa zwei Wochen alte Keimlinge wurden für 2 Tage bei 37 °C in X-Glc-A-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Blattpigmente durch Zugabe von 70 % Ethanol und Inkubation über Nacht bei 60 °C aus dem Gewebe herausgelöst. Die Dokumentation der gefärbten Pflanzen erfolgte mit dem Binokular.

Die Quantifizierung der GUS-Aktivität erfolgte mit einem Fluoreszenz-basierten Testsystem. Als Ausgangsmaterial dienten etwa zwei Wochen alte Keimlinge, 10 Pflanzen wurden mit 10 ml 4-MUG-Reaktionspuffer versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 100 μ l des Ansatzes entnommen und dazu 50 μ l 1 M Natriumcarbonat-Lösung zum Abstoppen der Reaktion hinzugefügt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im *Plate reader* bei 365 nm Anregungslicht und 455 nm Emission.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) dient der spezifischen Vermehrung von bestimmten DNA Abschnitten. In dieser Arbeit wurde die PCR für Klonierungen, Genotypisierungen und *Amplicon deep sequencing* angewandt. Die Schmelztemperatur von Primern wurde dabei nach folgender Formel berechnet:

$$T_M[^\circ\text{C}] = 4 * [G/C] + 2 * [A/T]$$

Die Elongationszeit und die genaue Reaktionszusammensetzung richtete sich jeweils nach der Länge des zu vermehrenden Abschnitts sowie nach den Herstellerangaben der jeweils eingesetzten Polymerase.

2.2.6.2 Aufreinigung von DNA Fragmenten

PCR-Produkte oder Plasmid-Fragmente, die für Klonierungen oder Sequenzierungen vorgesehen waren, wurden grundsätzlich aufgereinigt. Je nach Anwendung wurde die DNA entweder direkt aus der Reaktion aufgereinigt oder das gewünschte Fragment nach Auftrennung in einem Agarose Gel aus dem Gel extrahiert. Die Aufreinigung erfolgte jeweils nach den Herstellerangaben für das

verwendete Kit. Die Elution erfolgte in der Regel mit 30 μ l ddH₂O.

2.2.6.3 Klonierungen

Konventionelle Klonierungen wurden gemäß gängigen Methoden (Sambrook & Russell, 2001) und nach den Herstellerangaben für die jeweiligen Enzyme durchgeführt. Gateway Klonierungen erfolgten ebenfalls gemäß den Herstellerangaben. Ortsspezifische Mutagenese (*Site-directed mutagenesis*, SDM) erfolgte durch PCR-basierte Vermehrung des gewünschten Plasmids mit Primern, welche die gewünschte Veränderung bereits beinhalten. Auf die Vermehrung folgte ein Verdau mit *DpnI* um die methylierte Ausgangs-DNA zu zerstören. Nach anschließender Aufreinigung wurde der Ansatz in *E. coli* transformiert.

2.2.6.4 Klonierung von sgRNA Expressionskassetten

Für den Einsatz des in dieser Arbeit verwendeten CRISPR/Cas Systems muss zunächst die sgRNA auf die gewünschte DNA Zielsequenz eingestellt werden. Dazu wurden 20 bp 5' eines geeigneten PAM als Zielsequenz ausgewählt und entsprechende Oligonukleotide synthetisiert, welche die Sequenz enthalten. Zusätzlich wurden für die Klonierung 4 nt Überhang hinzugefügt, sodass sich für das erste Oligonukleotid die Sequenz 5'-ATTGN₂₀ ergibt, das zweite Oligonukleotid enthält die Sequenz 5'-AAACN₂₀, wobei dabei die revers komplementäre Sequenz der Zielsequenz eingesetzt wird.

Mit den beiden Oligonukleotiden wurde zunächst eine Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurden sie zu einer Konzentration von 2 μ M je Oligonukleotid in H₂O gemischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Für die eigentliche Hybridisierung wurde der Ansatz anschließend für 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Der für die Klonierung vorgesehene Vektor (pChimera, pEn-Chimera oder pEn-C1.1) wurde mit *BbsI* gemäß Herstellerangaben linearisiert und aufgereinigt. Durch die Linearisierung entstanden 5'-Überhänge, die komplementär zu den Überhängen der hybridisierten Oligonukleotide waren (Abbildung 2.1). Für die Klonierung wurden 3 μ l der Oligonukleotide mit 10 ng des linearisierten Vektors gemischt. Es wurden 5 μ l *Quick ligase buffer* (2x) und 1 μ l T4 Ligase zugegeben, und der Ansatz wurde für mindestens 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli*.

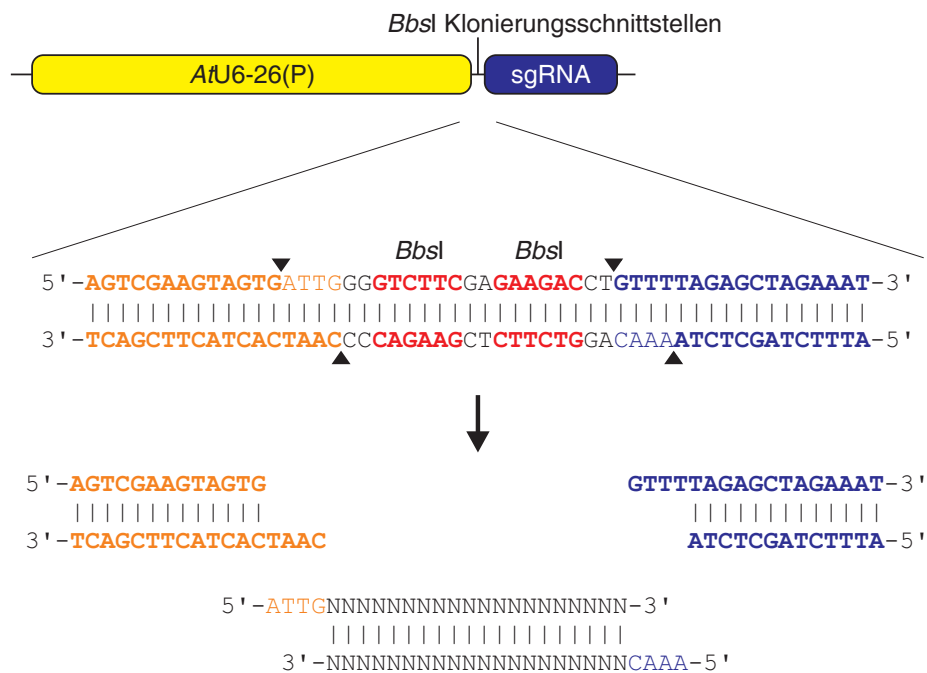


Abbildung 2.1: Klonierung einer sgRNA Expressionskassette. Durch Linearisierung des entsprechenden Plasmids mit dem TypII Restriktionsenzym *BbsI* entstehen zwischen U6-26 Promotor und der Sequenz für die sgRNA spezifische Überhänge, über die sich hybridisierte Oligonukleotide klonieren lassen. Dadurch wird das CRISPR/Cas Konstrukt auf die entsprechende Zielsequenz eingestellt.

2.2.6.5 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von PCR-Produkten und Plasmiden durch die Sanger-Methode wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Plasmid-DNA wurde dabei auf Konzentrationen zwischen 30 und 100 ng/ μ l eingestellt, PCR-Produkte auf 10 bis 50 ng/ μ l. Primer wurden separat in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l mitgeschickt.

NGS von PCR Produkten wurde von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mittels Roche 454 Technologie auf einem GS FLX+ System mit Titanium Chemie. PCR Produkte wurden dabei mit LibA und LibB Adaptern versehen und durch *Multiplex identifiers* (MIDs) markiert.

2.2.7 Auswertung von NGS Daten

Für die Datenanalyse wurden die Datensätze zunächst auf den Galaxy Server (Giardine *et al.*, 2005; Blankenberg *et al.*, 2010; Goecks *et al.*, 2010) hochgeladen und mit dem Modul *LastZ* wurden die Ein-

Material und Methoden

zelsequenzen (*Reads*) auf die entsprechende Referenzsequenz angepasst. Dabei wurden die Parameter '*Gap opening penalty*' und '*Gap extension penalty*' auf 100 beziehungsweise 10 heruntersgesetzt, damit die zu erwartenden Insertionen und Deletionen nicht herausgefiltert werden. Anschließend wurden die Daten in IGV (Robinson *et al.*, 2011; Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013) geöffnet und die Qualität des *Mappings* überprüft. Eventuell vorhandene schlecht zugeordnete *Reads* wurden aus dem Datensatz entfernt.

Die Quantifizierung von Mutation pro Position erfolgte entweder direkt in IGV, wo ein entsprechendes Histogramm ausgegeben wird. Alternativ wurde das Programm CRISPResso verwendet, welches spezifisch für die Analyse von Cas9-vermittelter Mutagenese entworfen wurde. Dabei wurde die minimale Identität, die ein *Read* zur Referenzsequenz haben muss, auf 60 % gesetzt, um abgebrochene oder fehlerhafte Sequenzen auszuschließen. Weiterhin kann ein Wert festgelegt werden, der die Region um die vorhergesagte Cas9 Schnittstelle herum begrenzt, in dem Mutationen in die Quantifizierung eingehen sollen. Dieser wurde im Fall der Cas9 Nuklease auf 20 bp begrenzt (also 10 bp in jede Richtung mit der Schnittstelle im Zentrum), bei gepaarten Nickasen auf 50 bp (für jede der beiden Zielsequenzen). Die durch CRISPResso ausgegebenen numerischen Werte wurden für die einzelnen Analysen verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Konzeption und Herstellung von Vektoren zur Expression von Cas9

Die in dieser Arbeit hergestellten Vektoren für ein *Arabidopsis*-spezifisches Cas9-Expressionssystem basieren auf den in der Arbeitsgruppe Puchta entworfenen und hergestellten Vektoren pCAS9-TPC und pEn-Chimera (Fauser *et al.*, 2014). Das Expressionssystem für Cas9 liegt dabei auf pCAS9-TPC und enthält die für *A. thaliana* Codon-optimierte Version von Cas9 unter der Kontrolle des Ubiquitin4-2 Promotors aus *Petroselinum crispum* (Kawalleck *et al.*, 1993) und dem pea3A Terminator aus *Pisum sativum* (Zhang *et al.*, 2010). Die für die sgRNA codierende Sequenz ist auf pChimera zu finden und steht unter der Kontrolle des U6-26 Promotors aus *A. thaliana* (Li *et al.*, 2007). Bei U6 Promotoren handelt es sich um eine Klasse von Promotoren, die spezifisch für die Rekrutierung von RNA Polymerase III verantwortlich sind. Diese Polymerase sorgt für die Expression kurzer, nicht-codierender RNAs wie *small nuclear RNA* oder *micro RNA*, und eignet sich daher für die Expression von sgRNAs. Ein eigener Terminator ist dabei nicht vorhanden, es reicht ein Terminations-signal, bestehend aus 7 aufeinanderfolgenden Thyminen. Die Spezifizierung einer sgRNA erfolgt durch die Linearisierung mit dem TypIIIS Restriktionsenzym *BbsI*. Dadurch entstehen spezifische 5'-Überhänge zwischen U6-Promotor und der sgRNA codierenden Sequenz, über die sich hybridisierte Oligonukleotide klonieren lassen, welche letztlich den *Spacer* und damit die Zielsequenz der sgRNA definieren (siehe Abschnitt 2.2.6.4). Die Klonierung der sgRNA Expressionskassette von pChimera nach pCAS9-TPC erfolgt auf konventionellem Weg durch das Restriktionsenzym *AvrII*, wodurch eine entsprechende Schnittstelle im *Spacer* ausgeschlossen wird.

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Konstrukte sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

3.1.1 Klonierung eines *Gateway*-kompatiblen Vektorsystems

Um die möglichen sgRNA Zielsequenzen zu erweitern und um den Klonierungsablauf zu vereinfachen, wurden Derivate der beiden Vektoren kloniert, die eine Klonierung mittels *Gateway* Technologie ermöglichen. Dazu wurde die komplette sgRNA Expressionskassette mittels PCR amplifiziert. Die dazu verwendeten Primer lieferten die *Attachment sites* attL1 und attL2 für die spätere *Gateway* Klonierung (SS40/SS41, siehe Tabelle 8.2 im Anhang). Der so gewonnene Sequenzabschnitt

wurde per TA-Klonierung in pGEM®-T-Easy eingebracht, wodurch pEn-Chimera erzeugt wurde. Passend zu diesem *Entry*-Vektor wurde pCAS9-TPC zu einem *Destination*-Vektor umkloniert. Dazu wurde ein Sequenzabschnitt, bestehend aus einem mit attR1 beziehungsweise R2 flankiertem *ccdB* Gen, aus dem Plasmid pSW-5 amplifiziert (Primer SS63/SS64) und mittels *AvrII* in kloniert, um so pDe-CAS9 herzustellen. Dadurch war es möglich, die sgRNA auf jede beliebige Zielsequenz einzustellen, die passend zu einem PAM zu finden ist und das fertige Konstrukt per *Gateway* Reaktion einfach in die passende T-DNA zu übertragen.

3.1.2 Klonierung von Cas9 Nickasen

Für die Herstellung der beiden Nickase Varianten von Cas9 war der spezifische Austausch von bestimmten Nukleotiden im Cas9 ORF nötig. Für den Aminosäureaustausch D10A, der für die Inaktivierung der RuvC-Domäne sorgt, wurde im Plasmid pCAS9-TPC mittels SDM ein Alanin an Position 29 gegen Cytosin ausgetauscht (Primer SS98/SS99), wodurch sich das entsprechende Codon von GAT (Asp) zu GCT (Ala) verändert. Die zweite Nickase mit der Mutation H840A im HNH-Motiv entstand auf die ähnliche Weise durch die Veränderung des Codons CAT (His) zu GCT (Ala) an den Positionen 2518 und 2519 (Primer SS100/SS101). Bei beiden resultierenden Plasmiden wurde zunächst der pflanzliche Resistenzmarker (das PPT-Resistenzgen *bar*) mittels *HindIII* entfernt, und durch ein Kanamycin-Resistenzgen (*nptII*) ersetzt, welches per PCR aus pPZP111 amplifiziert wurde (Primer SS30/SS31). Schließlich wurden beide Vektoren durch das Hinzufügen eines attR1/R2 flankierten *ccdB*-Gens für *Gateway*-Klonierung kompatibel gemacht (siehe Abschnitt 3.1.1).

3.1.3 Klonierung eines Vektorsystems zur Expression mehrerer sgRNAs

Für den Einsatz von gepaarten Nickasen in *A. thaliana* wurde das zuvor beschriebene Vektorset nochmals erweitert, um die Klonierung von Konstrukten zur Expression von zwei sgRNAs zu ermöglichen. Dazu wurde die Expressionskassette der sgRNA aus pChimera amplifiziert, beide dafür verwendeten Primer SS135 und SS136 wurden mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *MluI* und *Bsu36I* sowie mit attL1/L2 versehen. Der amplifizierte Sequenzabschnitt wurde zur Erzeugung von pEn-C1.1 erneut in pGEM®-T-Easy kloniert. Dieser weitere *Entry*-Vektor erlaubt die bereits beschriebene Spezifizierung der sgRNAs (siehe Abschnitt 2.2.6.4).

Ergebnisse

Zur Klonierung einer entsprechenden T-DNA zum Einsatz in *A. thaliana* wurden die beiden vorgesehenen sgRNA Sequenzen unabhängig voneinander in pEn-C1.1 kloniert. Anschließend wurde die erste Expressionskassette mittels konventioneller Klonierung über *Mlu*I und *Bsu*361 in pDe-Cas9-D10A eingebracht. Anschließend erfolgte die Klonierung der zweiten sgRNA-Sequenz durch *Gateway*-Klonierung, sodass sich schließlich die Expressionssysteme für beide sgRNAs und für Cas9-D10A auf der selben T-DNA befanden (Abbildung 3.1).

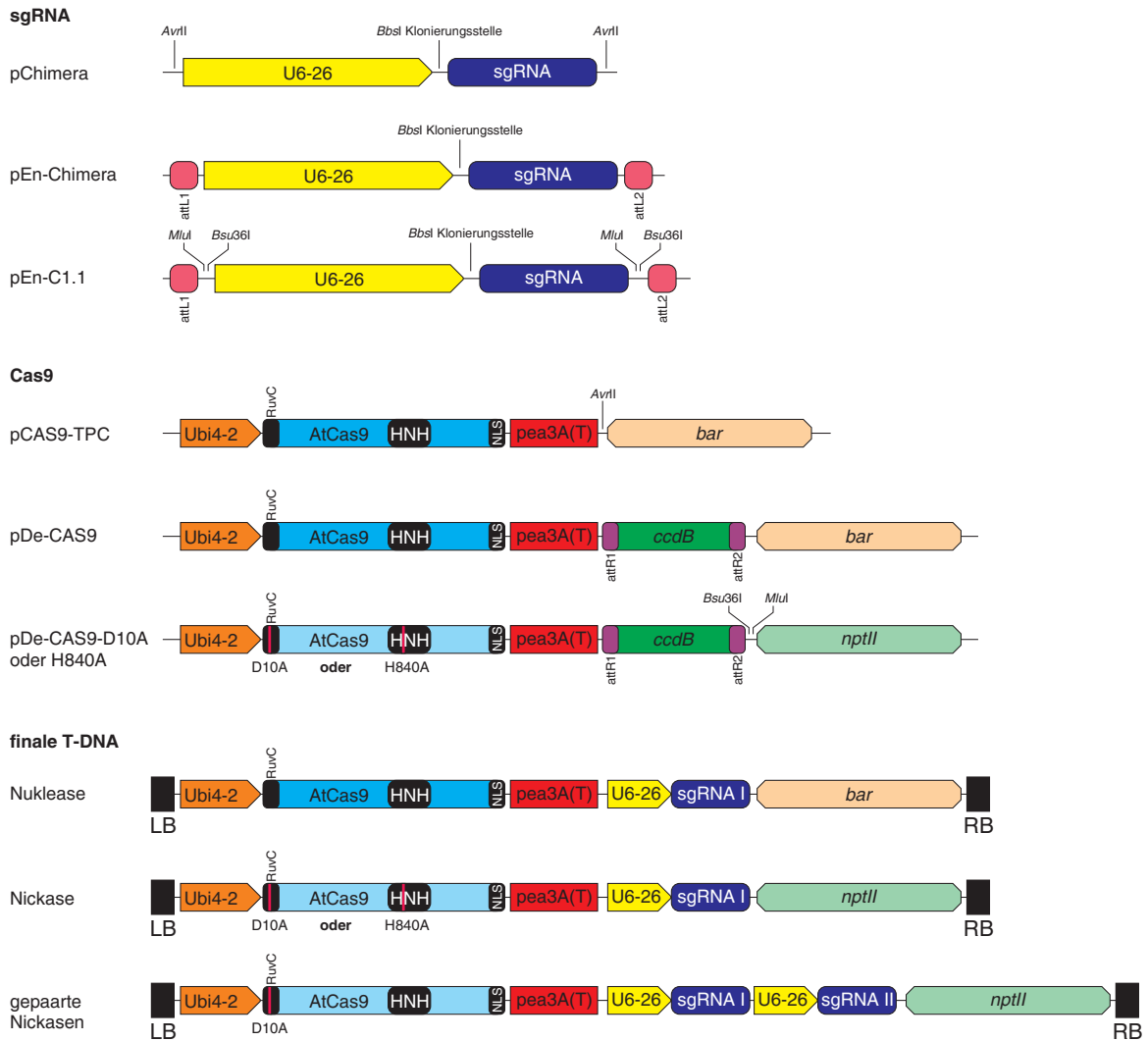


Abbildung 3.1: Übersicht über die eingesetzten Konstrukte. Die sgRNA Expressionskassette wird zunächst in pChimera, pEn-Chimera oder pEn-C1.1 spezifiziert (siehe Abbildung 2.1). Als Cas9 Expressionsvektoren stehen pCAS9-TPC, pDe-CAS9 und pDe-CAS9-D10A / H840A zur Verfügung, wobei pDe-CAS9 und pDe-CAS9-D10A / H840A kompatibel zu *Gateway*-Klonierung sind. Die finalen T-DNA Konstrukte können mittels *A. tumefaciens* stabil in *A. thaliana* transformiert werden.

3.2 Analyse von Cas9-vermittelter Mutagenese

3.2.1 *Deep sequencing* von Nuklease-vermittelten NHEJ Ereignissen

Die Induktion eines DSB in somatischem Pflanzengewebe führt in den meisten Fällen zu dessen Reparatur durch NHEJ (siehe Abschnitt 1.1.1). Aufgrund der Tatsache, dass NHEJ häufig zur Ausbildung kleiner Insertionen oder Deletionen führt, kann es dadurch zur Verschiebung des Leserasers und damit zum *Knock-out* des entsprechenden Gens kommen.

Für die Analyse der Effizienz und Qualität, mit dem das verwendete System gezielte Mutagenesen erzeugt, wurde ein *Amplicon deep sequencing* durchgeführt. Zunächst wurde im *RTEL*-Locus (*Regulator of telomere length 1*, AT1G79950, Recker *et al.*, 2014) von *A. thaliana* eine geeignete Zielsequenz für die sgRNA ausgewählt, die passend zu einem 'NGG'-PAM lag. Die entsprechende sgRNA-codierende Sequenz wurde in pEn-Chimera assembliert (Oligonukleotide SS116/SS117) und anschließend per *Gateway* Klonierung in pDe-CAS9 eingebracht, was zum Expressionsvektor pRTEL-CAS führte. Das Konstrukt wurde durch *A. tumefaciens* stabil in *A. thaliana* eintransformiert und transgene T1 Pflanzen wurden auf PPT-haltigem Medium selektiert. Von 30 Primärtransformanten wurde gesammelt DNA extrahiert (optimierte Isolation) und ein PCR-Amplikon hergestellt, welches die Zielsequenz der sgRNA enthielt (Primer SS148/SS150 inklusive MID). Das Amplikon wurde mittels Roche 454 Technologie einem NGS unterzogen. Insgesamt wurden 27.366 einzelne Sequenzen, sogenannte *Reads*, erhalten. Diese wurden der *RTEL1* Referenzsequenz zugeordnet und anschließend auf deren Abweichung von der Referenz hin untersucht.

Im Bereich der sgRNA Zielsequenz zeigte sich eine deutlich erhöhte Frequenz von Sequenzabweichungen (Abbildung 3.2). Diese erreicht ihren höchsten Wert an der 4. Position *downstream* des PAM, hier weisen 26,7 % aller *Reads* eine Veränderung zur Referenz auf. Diese Mutationen lassen sich weiter aufteilen in Insertionen, die mit 23,8 % den größten Anteil ausmachen, Deletionen lassen sich zu 2,8 % an dieser Position finden. Basenaustausche treten zwar grundsätzlich auf, nehmen aber mit 0,1 % an dieser Position und auch über einen größeren Sequenzabschnitt hinweg nur einen sehr geringen Anteil an Mutationen ein, wahrscheinlich handelt es sich in den allermeisten Fällen um Sequenzierfehler (Abbildung 3.2).

Die Quantifizierung von Mutationen unabhängig ihrer Position erfolgte mit der Software CRIS-

Ergebnisse

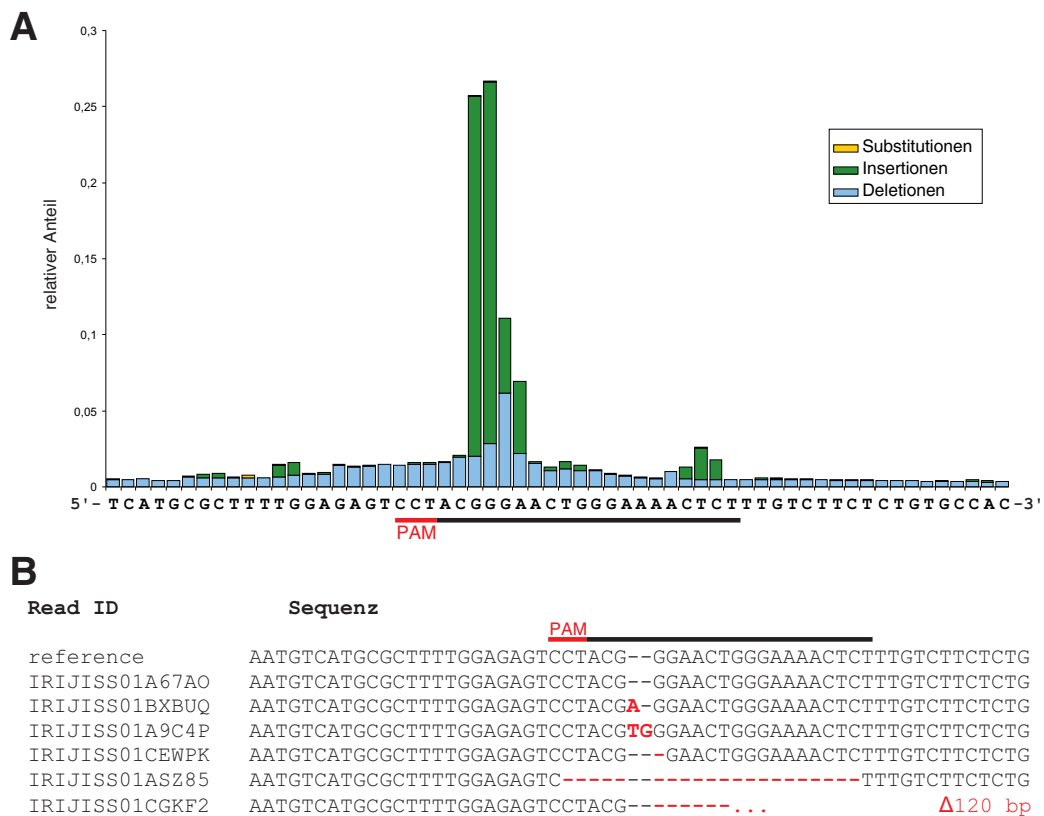


Abbildung 3.2: Deep sequencing Analyse der durch eine Cas9 Nuklease verursachten NHEJ Ereignisse.

A Darstellung des relativen Anteils mutierter Reads an der gesamten Read Anzahl pro Position. Die X-Achse stellt den entsprechenden Ausschnitt aus der *RTEL1* Referenzsequenz dar, die sgRNA Zielsequenz und das PAM sind markiert. Der höchste Anteil von Mutationen findet sich mit 26,8 % 4 bp *downstream* des PAM, wobei es sich dabei vorwiegend um Insertionen handelt. **B** Alignment ausgewählter Reads. Häufig handelt es sich bei den Mutationen um kleine Insertionen, aber auch größere Veränderungen sind zu finden. Die gesamte Anzahl an Reads beträgt 27.366.

PResso. Dabei wurden nur Mutationen in die Analyse einbezogen, welche in einem Fenster von 20 bp um die erwartete Cas9 Schnittstelle zu finden waren. Dabei lag der gesamte Anteil an von NHEJ betroffenen Reads bei 35,6 %. Abbildung 3.2B gibt eine Auswahl von Reads an, die im Datensatz zu finden waren. Dabei zeigte sich, dass die entstehenden Veränderungen meist klein sind, also nur wenige bp inseriert oder deletiert wurden. Die exakte Quantifizierung der Größen von Insertionen und Deletionen bestätigte diesen Eindruck (Abbildung 3.3). Insgesamt machten Deletionen 6,8 % aller Reads aus, Insertionen 28,5 %, wobei die Deletion beziehungsweise Insertion eines einzelnen bp am häufigsten vertreten war (3,5 % und 27,9 %). Die größte Deletion, die sich nach der Zuordnung der Reads finden ließ, umfasst 120 bp, die größte Insertion 69 bp.

Weitere Experimente, die nicht Teil dieser Arbeit sind, konnten zeigen, dass die durch die hier ver-

Ergebnisse

wendete Cas9 Nuklease erzeugten Mutationen auch in die pflanzliche Keimbahn eingehen können und damit in die nächste Generation weitervererbt werden (Fauser *et al.*, 2014), was den Einsatz der Nuklease für biotechnologische Zwecke ermöglicht.

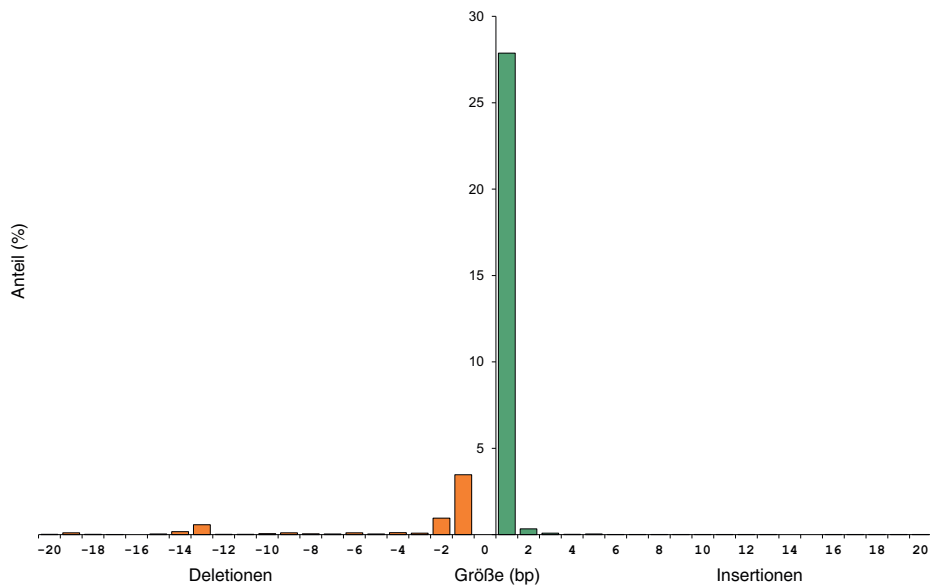


Abbildung 3.3: Größenverteilung von durch Cas9 Nuklease verursachten Mutationen. Dargestellt sind die relativen Anzahlen von Deletionen (links) und Insertionen (rechts) verschiedener Größen. Dabei zeigt sich klar, dass der häufigste Typ von Mutationen die Insertion eines einzelnen bp ist; auch Deletionen umfassen meistens nur ein bp. Deletionen, die größer als 20 bp sind, finden sich zu 0,8 %, Insertionen von mehr als 20 bp zu 0,1 %. Wildtypische Sequenzen (X-Position 0) sind nicht dargestellt.

3.2.2 Deep sequencing von Nickase-vermittelten NHEJ Ereignissen

In einem parallelen Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob auch durch eine Cas9 Nickase NHEJ vermittelte Mutagenese nachweisbar ist. Da im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass SSBs nicht durch NHEJ sondern durch präzise Reparaturmechanismen repariert werden, sollten sich als Folge einer gezielten Induktion eines SSB auch keine Mutationen finden lassen.

Die sgRNA, welche bereits für die Analyse der Nuklease-induzierten Mutagenese entworfen und kloniert wurde, kam auch bei diesem Versuch zum Einsatz, wurde aber durch Klonierung in pDe-CAS9-D10A mit der D10A Variante von Cas9 kombiniert. Wie zuvor wurde das Konstrukt in *A. thaliana* eintransformiert, von 30 selektierten Primärtransformanten gesammelt DNA extrahiert und ein PCR Produkt generiert, welches der NGS Analyse unterzogen wurde (Primer SS149/SS150).

Abbildung 3.4 zeigt die Auswertung der Sequenz Reads, indem die relative Gesamtmenge von Mu-

tationen gegen die jeweilige Position in der Referenzsequenz aufgetragen ist. Insgesamt wurden 38.719 *Reads* generiert. An den Positionen um die Schnittstelle von Cas9 3 beziehungsweise 4 bp *downstream* des PAM findet sich eine Gesamtmenge von 3 und 7 mutierten *Reads*. Der höchste Wert innerhalb der Bindestelle der sgRNA liegt mit 145 Mutationen an Position 18. Diese Menge entspricht einer relativen Anzahl von weniger als 0,4 %. Diese im Vergleich zum zuvor beschriebenen Experiment extrem niedrigen Werte legen die Vermutung nahe, dass es sich dabei lediglich um Sequenzierfehler und damit Hintergrundrauschen handelt. Man kann also davon ausgehen, dass die untersuchte Cas9 Nickase tatsächlich nicht in der Lage dazu ist, NHEJ zu induzieren.

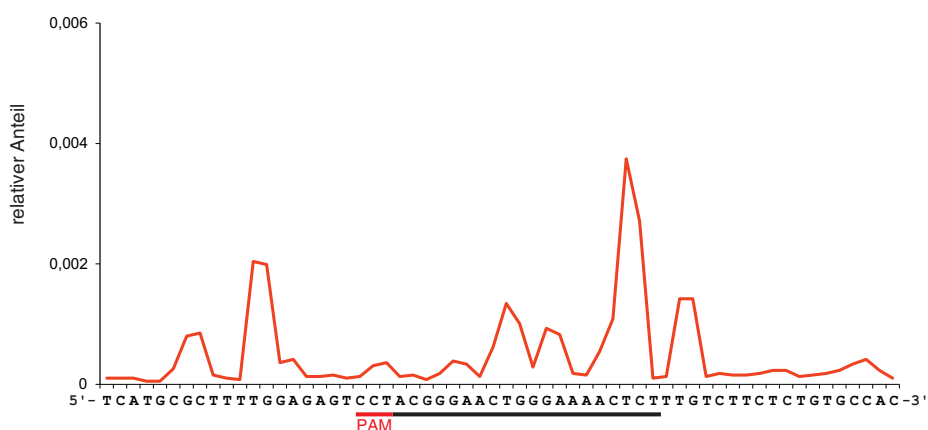


Abbildung 3.4: Deep sequencing eines genomischen Locus nach SSB Induktion. Dargestellt sind die relativen Anzahlen an mutierten Sequenz *Reads* pro Position aus insgesamt 38.719 *Reads*. Dabei zeigt sich keine erkennbare Induktion von Mutationen an der Position 4 bp *downstream* des PAM, wo der SSB induziert wird. Die detektierbaren Mutationen stellen lediglich Hintergrundrauschen dar.

3.3 Analyse der Induktion von HR durch Cas9 Nukleasen und Nickasen

Neben der Untersuchung von NHEJ Ereignissen, wurde in einem weiteren Experiment ermittelt, ob durch Cas9 erzeugte DSBs und SSBs eine Erhöhung von somatischer HR zur Folge haben können. Dazu kamen die Linien DGU.US und IU.GUS von *A. thaliana* zum Einsatz, welche homozygot stabil transformierte HR Reporterkonstrukte tragen (Orel *et al.*, 2003, Abbildung 3.5). Beide Reporter tragen die Sequenz für das bakterielle *uidA* Gen (*GUS*), welche für das Enzym β -Glucuronidase codiert, die allerdings durch eine kurze *Spacer* Sequenz unterbrochen und dadurch nicht funktionell ist. Durch somatische HR kann die Sequenz restauriert werden, die Expression des Enzyms kann dann durch histochemische Färbung mit X-GlcA nachgewiesen werden. Dabei zeigt DGU.US auf-

Ergebnisse

grund des Aufbaus mit zwei aufeinanderfolgenden Sequenzwiederholungen Rekombination durch SSA an, IU.GUS berichtet SDSA-vermittelte Rekombination. Beide Reporter tragen in der *Spacer* Sequenz eine Schnittstelle für *I-SceI*, sodass die HR mit einem gezielten DSB durch die Meganuklease induziert werden kann (Abbildung 3.5).

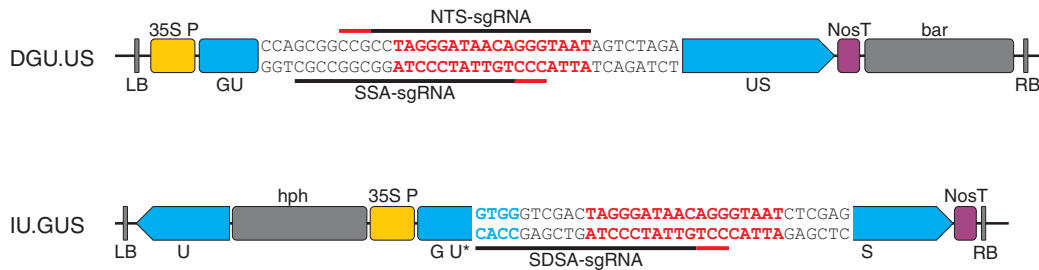


Abbildung 3.5: Reporterstrukturen, die für den Nachweis induzierter HR eingesetzt wurden. Die beiden Reporter DGU.US und IU.GUS sind stabil und homozygot im Genom von *A. thaliana* Pflanzen. Beide basieren auf einer unterbrochenen GUS-Sequenz, die unterbrechende *Spacer* Sequenz ist komplett dargestellt. Darin befindet sich eine Erkennungssequenz für *I-SceI* (rot), außerdem wurden sgRNAs hergestellt, die an den markierten Stellen am entsprechenden DNA-Strang binden können. Aufgrund des repetitiven Abschnittes *up-* und *downstream* des *Spacers* kann DGU.US durch SSA repariert werden, was zu einer intakten GUS-Sequenz führt. IU.GUS kann durch SDSA repariert werden, dazu wird die *upstream* liegende intakte Teilsequenz von GUS ('U') als Matrize verwendet.

Für beide Reporter wurden sgRNAs entworfen und kloniert, die spezifisch an die *Spacer* Sequenz binden können (Abbildung 3.5, SSA-sgRNA mittels der Oligonukleotide SS44/SS45 und SDSA-sgRNA, Oligonukleotide SS46/47). Diese wurden in pDe-CAS9 beziehungsweise pDe-CAS9-D10A übertragen, sodass entsprechende Expressionskonstrukte für Cas9 Nukleasen und Nickasen entstanden. Im Fall des Nukleasekonstruktes für DGU.US wurde außerdem der Resistenzmarker von *bar* auf *nptII* verändert, da bereits der Reporter selbst eine entsprechende PPT-Resistenz vermittelt. Dies wurde durch die Klonierung eines aus pPZP111 generierten PCR-Produktes des *nptII*-Gens mittels *HindIII* erreicht. Die Konstrukte SSA-Cas-KanR, SSA-D10A, SDSA-Cas und SDSA-D10A wurden in die entsprechenden Reporterlinien eintransformiert und es wurden Primärtransformanten selektiert. Als Positivkontrolle für das Experiment wurde parallel in beide Reporterlinien ein *I-SceI* Expressionskonstrukt transformiert, das vom selben Expressionssystem aus Ubi4-2 Promotor und *pea3A* Terminator kontrolliert wurde, das auch für Cas9 verwendet wurde (Fauser *et al.*, 2012). Um einen grundsätzlichen Eindruck von der Induktion von HR durch die verschiedenen Enzyme zu bekommen, wurden die Primärtransformanten nach zwei Wochen Wachstum mit X-GlcA gefärbt (Abbildung 3.6). Sehr starke Färbungen zeigten sich für alle verwendeten Konstrukte. Zu erkennen waren zahlreiche blaue Punkte und auch große, gefärbte Sektoren. Im Gegensatz dazu zeigten

Ergebnisse

die Negativkontrollen, bei denen kein Konstrukt transformiert wurde, nur wenige einzelne blaue Punkte. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Cas9 Nuklease als auch Nickase in der Lage dazu sind, in beiden Reportern HR induzieren.

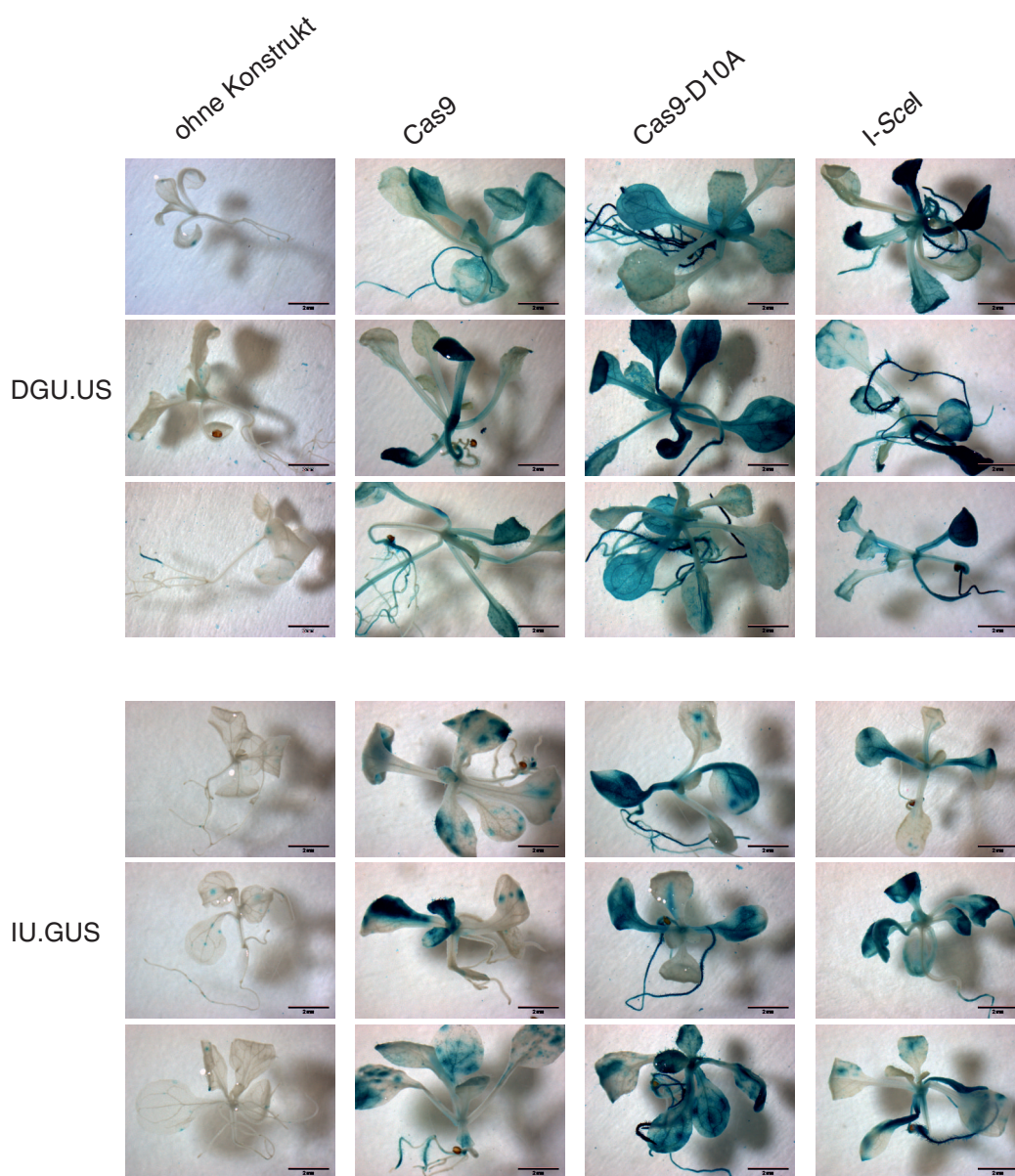


Abbildung 3.6: X-GlcA Färbung von DGU.US und IU.GUS Pflanzen mit Cas9 und Cas9-D10A Konstrukten. Gefärbt wurden zwei Wochen alte Primärtransformanten (T1) mit dem jeweiligen Nuklease- oder Nickasekonstrukt. Sowohl die Induktion eines DSB durch Cas9 als auch eines SSB durch Cas9-D10A sorgt in beiden Reporterlinien für große angefärbte Sektoren, vergleichbar mit der Färbung, die durch I-SceI erzeugt wird. In den Negativkontrollen (Reporterlinien ohne Konstrukt) sind dagegen nur vereinzelt blaue Punkte zu sehen. Sowohl die Cas9 Nuklease als auch die Nickase können also in beiden Reportern HR induzieren. Größenmaßstab: 2 mm.

Für eine korrekte Quantifizierung der HR wurde ein Fluoreszenz-basiertes Testsystem angewendet. Statt der histochemischen Färbung mit X-GlcA wurde 4-MUG als Substrat der enzymatischen Reaktion genutzt, das von der β -Glucuronidase zum fluoreszenten 4-MU umgesetzt wird. Erneut wurden zwei Wochen alte Primärtransformanten mit den jeweiligen Nuklease- oder Nickasekonstrukten eingesetzt (Cas9, Cas9-D10A und I-SceI, untransformierte Reporterlinien und Col-0 Wildtyp (WT) dienten als Negativkontrollen). Das Experiment wurde in drei Replikaten durchgeführt, wobei für jedes Replikat jeweils 10 Pflanzen jeder Linie für die Analyse eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung nach 10 min Inkubation sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Der Eindruck der qualitativen Färbung mit X-GlcA bestätigte sich dabei: Es konnte ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenz zwischen den Linien mit Nuklease- oder Nickasekonstrukt gegenüber den Negativkontrollen festgestellt werden. Bei den Proben mit DSB oder SSB Induktion zeigte sich in allen Fällen eine höhere Aktivität für DGU.US gegenüber IU.GUS, was übereinstimmend mit früheren Studien ist, bei denen diese Linien zum Einsatz kamen (Orel *et al.*, 2003; Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). Bei beiden Reportern sorgte die Cas9 Nuklease für eine leicht geringere HR Rate als I-SceI. Interessanterweise wurden die höchsten Werte bei den beiden Linien durch die Cas9 Nickase erreicht.

3.3.1 Vergleich von SSBs auf codogenem und nicht-codogenem DNA-Strang

Kürzlich durchgeführte Versuche in menschlichen Zellen gaben Hinweise darauf, dass es einen Reparaturmechanismus für SSBs geben könnte, der mit Transkription assoziiert ist (Davis & Maizels, 2014). Als Folge wurden unterschiedliche Raten an HR nachgewiesen, wenn ein SSB innerhalb eines Gens auf dem transkribierten (codogenen, *antisense*) Strang oder auf dem nicht-transkribierten (nicht-codogenen, *sense*) Strang (NTS) der DNA vorliegt. Im zuvor beschriebenen Experiment wurde der SSB auf dem transkribierten Strang induziert, da die Cas9-D10A Nickase den SSB auf dem Strang ausbildet, an dem die sgRNA bindet (Abbildung 3.5, Jinek *et al.*, 2012).

Um zu überprüfen, ob sich auch im hier verwendeten pflanzlichen Reportersystem Unterschiede zwischen SSBs auf den beiden DNA-Strängen finden lassen, wurde für DGU.US eine zweite sgRNA entworfen und kloniert, welche auf dem NTS bindet und durch Cas9-D10A auf diesem Strang ein SSB induziert werden kann (Abbildung 3.5, NTS-sgRNA, Oligonukleotide NB25/NB26). Für IU.GUS war dies nicht möglich, da hier kein passendes PAM für die zweite Orientierung zur

Ergebnisse

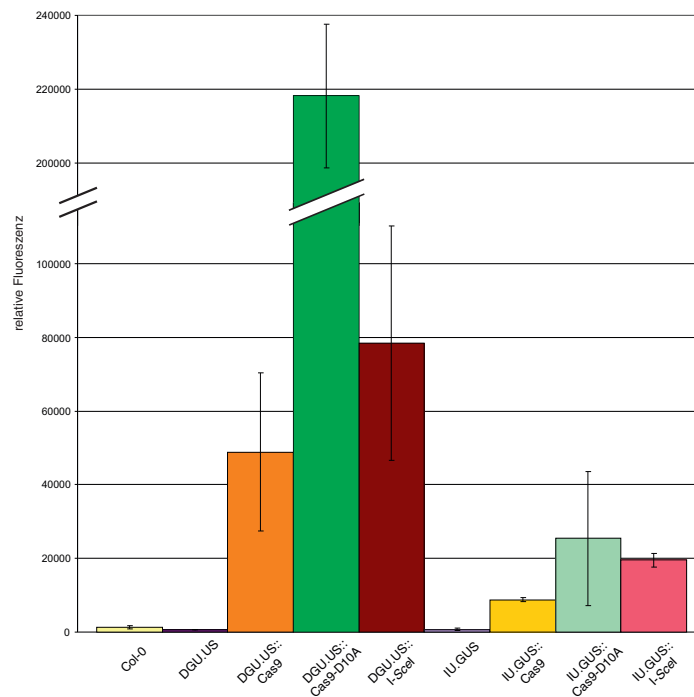


Abbildung 3.7: Quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität nach DSB- oder SSB-Induktion. Die gemessenen Fluoreszenzen geben Aufschluss über den Grad der HR Induktion durch das jeweilige Nuklease- oder Nickasekonstrukt. Untransformierte Col-0 (WT), DGU.US und IU.GUS Pflanzen dienten als Negativkontrolle, das zum Vergleich eingesetzte I-SceI steht im gleichen Expressionssystem wie Cas9. Die Cas9 Nuklease sorgt in beiden Reportern für eine leicht geringere HR Rate als I-SceI, die höchste Induktion wird durch die Cas9 Nickase vermittelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an; die der Abbildung zugrunde liegenden Werte sind in Abschnitt 8.3 im Anhang zu finden.

Verfügung stand. Die beiden Konstrukte SSA-D10A und SSA-D10A-NTS wurden stabil in DGU.US eintransformiert und selektierte Primärtransformanten wurden der bereits beschriebenen qualitativen und quantitativen Bestimmung der GUS-Aktivität unterzogen.

Abbildung 3.8A zeigt repräsentative Pflanzen, die mit X-GlcA gefärbt wurden. Für beide Konstrukte zeigt sich ein ähnliches Bild wie zuvor mit großen angefärbten Sektoren. Die Daten der Fluoreszenzmessung gibt Abbildung 3.8B wieder. Dabei repräsentieren die Kurven wiederum die Ergebnisse von drei unabhängigen Messungen. Es zeigt sich, dass ein Unterschied zwischen den beiden Konstrukten nicht erkennbar ist, beide Kurven liegen zu jedem gemessenen Zeitpunkt auf nahezu gleicher Höhe und nehmen daher den gleichen Verlauf. Im hier vorliegenden pflanzlichen Reportersystem lassen sich also keine Unterschiede in der HR durch Induktion eines SSB auf den verschiedenen DNA Strängen feststellen.

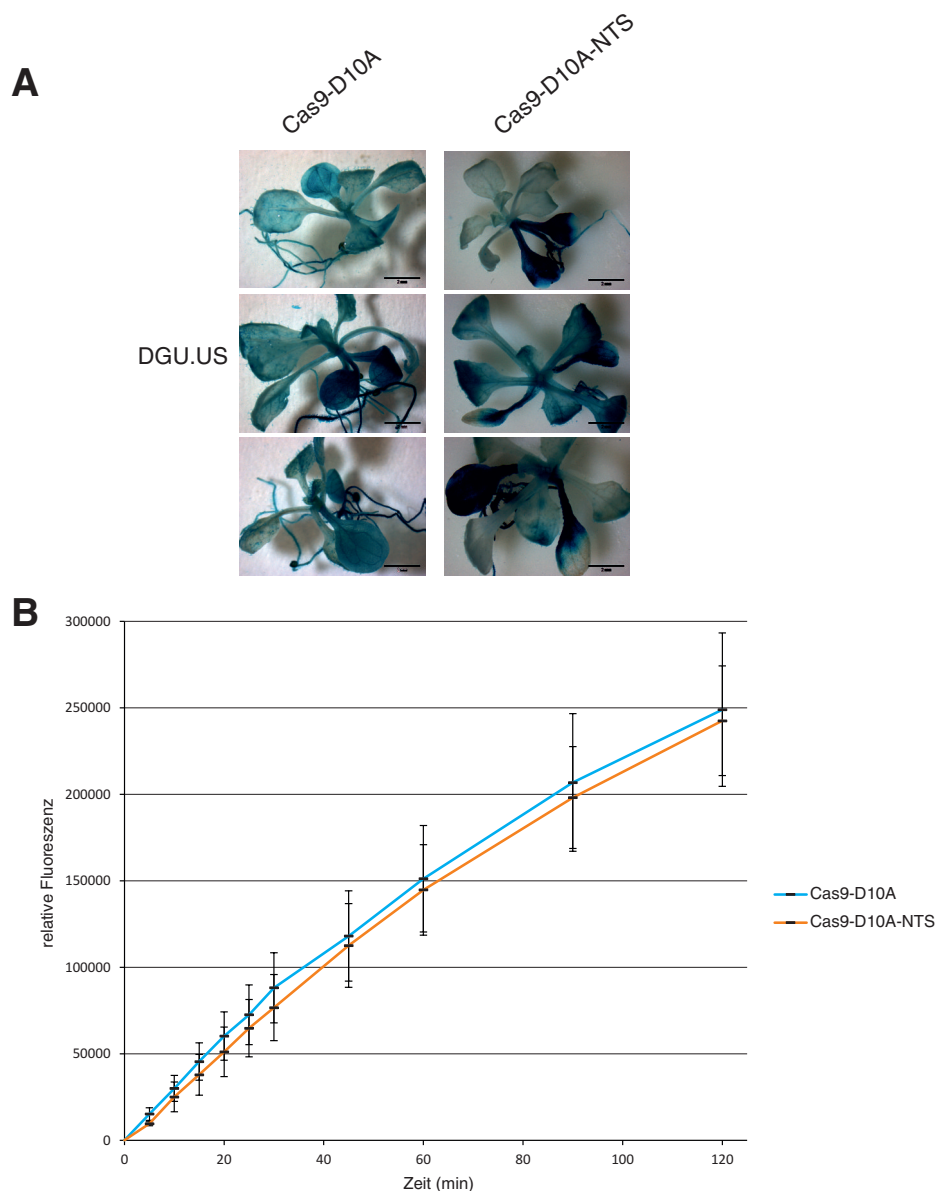


Abbildung 3.8: Vergleich von HR nach SSB-Induktion auf den beiden DNA-Strängen. **A** Histochemische Färbung von Pflanzen mit X-GlcA. Für beide verwendete Konstrukte ergeben sich große gefärbte Bereiche, egal ob ein SSB auf dem transkribierten (Cas9-D10A) oder dem nicht-transkribierten (Cas9-D10A-NTS) DNA Strang vorlag. Größenmaßstab: 2 mm. **B** Die exakte Quantifizierung durch das Fluoreszenz-basierte 4-MUG Testsystem bestätigt diesen Eindruck. Beide Kurven zeigen den gleichen Verlauf und liegen nahezu auf der selben Höhe. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an; die der Abbildung zugrunde liegenden Werte sind in Abschnitt 8.3 im Anhang zu finden.

3.3.2 Vergleich der Aktivität der beiden Cas9 Nickasen D10A und H840A

Das GUS-basierte Reportersystem konnte dazu benutzt werden zu überprüfen, ob die beiden Cas9 Nickasen (D10A und H840A) Unterschiede in ihrer Aktivität zeigen: Da im vorherigen Experiment kein Unterschied der HR zwischen SSBs in den beiden DNA-Molekülen feststellbar war, sollte die Messung von HR bei Induktion von SSBs durch die beiden Enzyme mit der selben sgRNA direkt Aufschluss über die Effizienz geben, mit dem SSBs erzeugt werden können.

Dazu wurde die sgRNA Sequenz für die Reporterlinie IU.GUS (Abbildung 3.5, SDSA-sgRNA) in die beiden Vektoren pDe-CAS9-D10A und pDe-CAS9-H840A kloniert, um entsprechende Nickase-Expressionskonstrukte für die beiden Enzyme zu erhalten. Diese wurden stabil in *A. thaliana* eintransformiert und 2 Wochen alte Primärtransformanten wurden im Experiment untersucht.

Bereits die Betrachtung der histochemisch gefärbten Pflanzen (Abbildung 3.9A) vermittelte den Eindruck, dass es durch D10A zu einer höheren Induktion von HR kam. Zwar zeigten sich auch bei H840A deutlich angefärbte Sektoren, insgesamt scheint es aber auch wesentlich mehr Bereiche zu geben, die nicht gefärbt wurden. Die quantitative Bestimmung bestätigte diesen Eindruck (Abbildung 3.9B). Die Messung zeigte einen wesentlich höheren Wert für das D10A Konstrukt, pro Zeitpunkt der Messung lag die relative Fluoreszenz von D10A etwa eine Größenordnung über der von H840A. Da es sich um die selbe sgRNA handelte, und eine Präferenz der HR für SSBs auf den beiden DNA Molekülen nicht vorliegt (Abschnitt 3.3.1), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass das HNH-Motiv (D10A) eine deutlich höhere Aktivität besitzt als die RuvC Domäne (H840A).

3.4 Etablierung und Analyse von gepaarten Cas9 Nickasen zur zielgerichteten Mutagenese in Pflanzen

Um eine höhere Spezifität von Cas9 für die zielgerichtete Induktion von NHEJ zu erreichen, sollte der Einsatz gepaarter Nickasen mit den zuvor charakterisierten Cas9 Konstrukten für den Einsatz in Pflanzen adaptiert werden. Durch Induktion eines SSB auf je einem der beiden DNA Stränge durch eine Cas9 Nickase in räumlicher Nähe sollte ein DSB entstehen, der für die Induktion von NHEJ sorgt.

Für die Etablierung von gepaarten Nickasen wurden zwei passende sgRNA Erkennungssequenzen im *RTEL1* Locus von *A. thaliana* ausgewählt. Zum einen wurde die sgRNA eingesetzt, die bereits

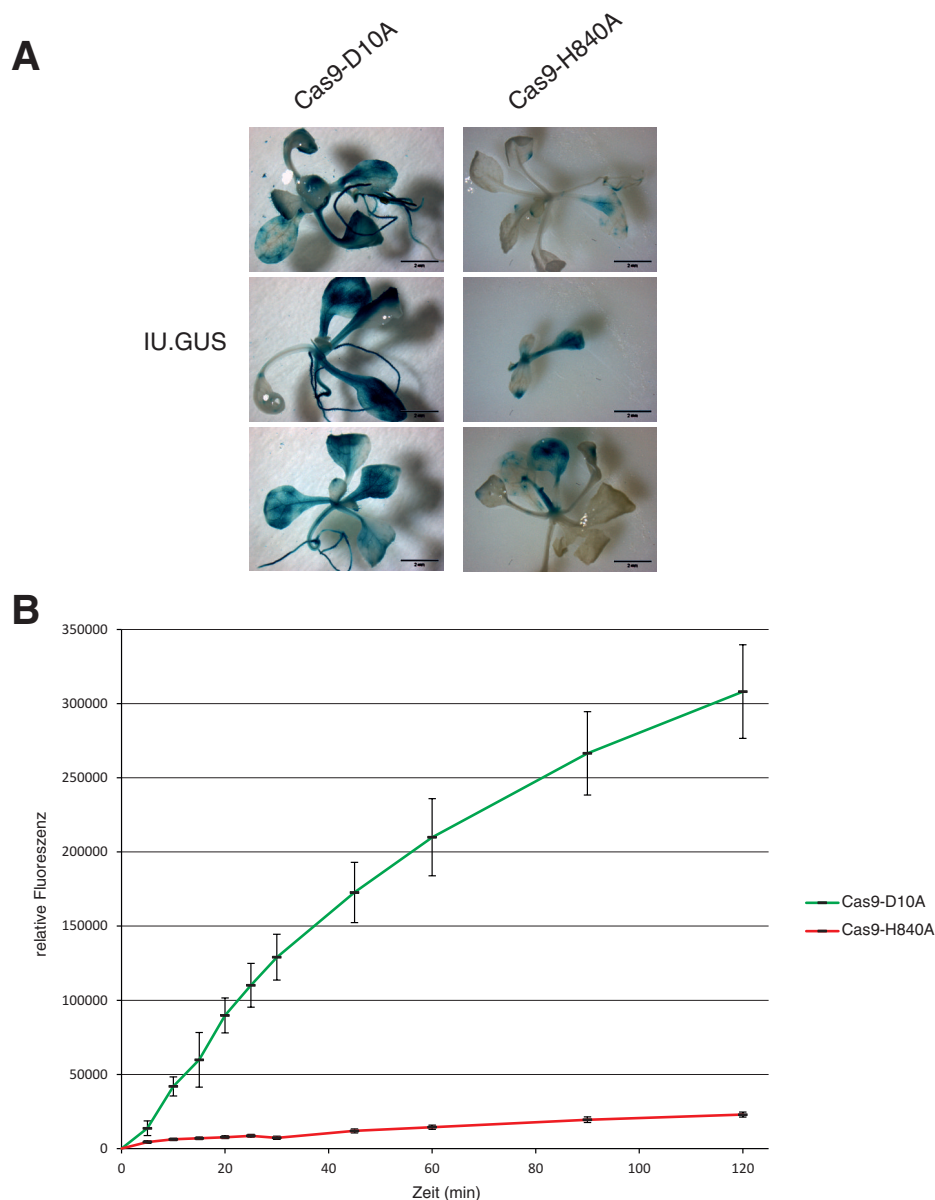


Abbildung 3.9: Vergleich der Effizienz der beiden Cas9 Nickasen D10A und H840A. **A** Histochemische Färbung von Pflanzen mit X-GlcA (Größenmaßstab: 2 mm). Wo im Fall von Cas9-D10A die Pflanzen zum Teil komplett angefärbt werden, sind bei Cas9-H840A nur einzelne Bereiche des Gewebes von der Blaufärbung betroffen. Die Quantifizierung durch das Fluoreszenz-basierte 4-MUG Testsystem (**B**) bestätigt diesen Eindruck, die gemessene Fluoreszenz liegt bei D10A um etwa eine Größenordnung über der von H840A. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an; die der Abbildung zugrunde liegenden Werte sind in Abschnitt 8.3 im Anhang zu finden.

zur Analyse von DSB- und SSB-induziertem NHEJ eingesetzt wurde (Abschnitt 3.2). Passend dazu wurde eine zweite Erkennungssequenz gewählt, die eine umgekehrte Orientierung aufwies (also

Ergebnisse

das PAM auf der anderen Seite lag) und in einem Abstand von 18 bp zur ersten Erkennungssequenz lag. Die beiden sgRNA Sequenzen wurden in pEn-C1.1 assembliert (Oligonukleotide SS116-SS119) und nacheinander in pDe-CAS9-D10A kloniert. Aufgrund der Ergebnisse zur Effizienz der verfügbaren Nickasen (Abschnitt 3.3.2) wurde D10A als die aktivere der beiden Nickasen gewählt, die Lage und Orientierung der zu induzierenden SSBs sollte in diesem Fall für die Bildung von 53 nt langen 5'-Überhängen führen (Abbildung 3.10A). Nach Transformation des Konstruktes in *A. thaliana* wurden Primärtransformanten identifiziert und nach zwei Wochen aus 30 Pflanzen gesammelt DNA extrahiert. Es wurde ein PCR-Produkt über die relevante Stelle im *RTEL1* Locus generiert (Primer SS148/SS150) und der NGS Analyse unterzogen.

Abbildung 3.10B gibt die Ergebnisse der Auswertung wieder. Wie zuvor beschrieben wurden die erhaltenen *Reads* (72.187) der Referenzsequenz zugeordnet und die relative Anzahl an mutierten *Reads* pro Position aufgetragen. Die Analyse ergibt einen markanten Verlauf, mit zwei Maxima von 17,3 % und 12,7 % an den Positionen der sgRNA Zielsequenzen. Auffällig ist die Tatsache, dass es sich im Gegensatz zu den Daten der einzelnen Nuklease (Abbildung 3.2) deutlich häufiger um Deletionen handelt als um Insertionen. Die Analyse durch CRISPResso ergab eine gesamte Frequenz von 41,7 % *Reads*, die eine Mutation im relevanten Bereich um die Zielsequenzen herum enthalten.

Da die Auswertung der Mutationen pro Position (Abbildung 3.10) keinerlei Aussage über die Ausbreitung von einzelnen Deletionen und die Größe von Insertionen macht, wurde auch dieser Datensatz mit CRISPResso auf die Größe von Insertionen und Deletionen hin analysiert (Abbildung 3.11). Dabei zeigte sich zunächst, dass sich der Eindruck bestätigen ließ, dass im hier vorliegenden Fall mehr Deletionen zu finden waren. Insgesamt ließen sich in den *Reads* zu 26,1 % Deletionen nachweisen, Insertionen zu 11,9 %. Weiterhin zeigte die Analyse, dass es nicht wie beim Einsatz der Cas9 Nuklease fast ausschließlich zu kleinen Veränderungen kam. Zwar bildet die Gruppe von Deletionen bis 10 bp den größten Anteil der Mutationen (7,9 % der *Reads*), dennoch sind auch größere Deletionen ähnlich häufig vertreten. Ähnlich fällt die Betrachtung von Insertionen aus. Bis zu einer Länge von 40 bp treten Insertionen etwa gleich häufig auf, erst Insertionen über 40 bp Länge sind seltener.

Insgesamt führte die Anwendung gepaarter Nickasen verglichen mit einer Cas9 Nuklease zu einer breiteren Verteilung von Mutationen entlang des genomischen Locus und zu größeren Verände-

Ergebnisse

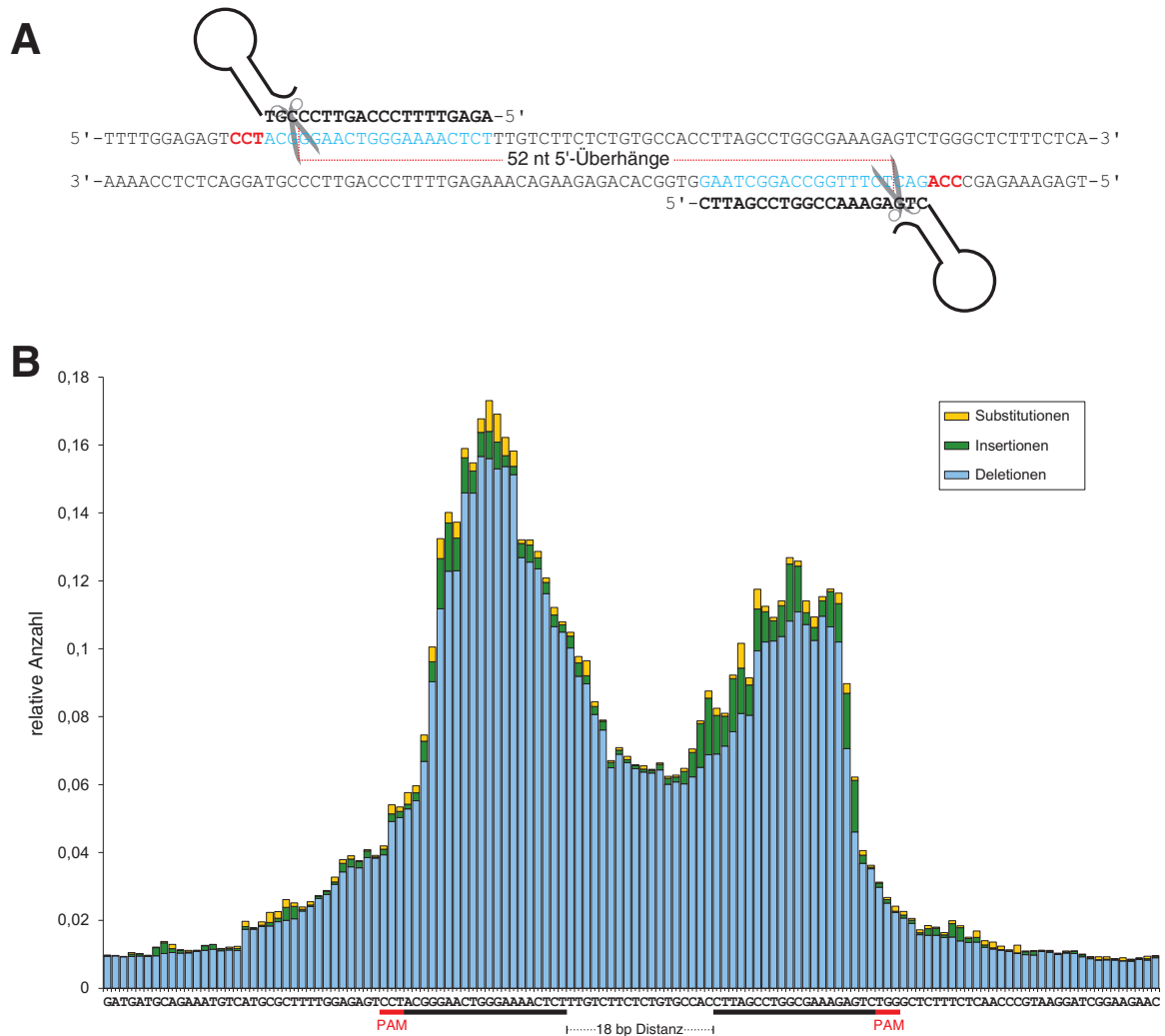


Abbildung 3.10: Deep sequencing Analyse der durch gepaarte Cas9 Nickasen verursachten NHEJ Ereignisse. A Schematische Darstellung der Orientierung von sgRNAs und SSBs im *RTEL1* Locus. B Darstellung der NGS Ergebnisse. Die relativen Anzahlen von Substitutionen, Insertionen und Deletionen sind pro Position der Referenzsequenz angegeben. Die beiden Maxima im Bereich der sgRNA Zielsequenzen liegen bei 17,3 % und 12,7 %. Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach Induktion eines einzelnen DSB werden hier die meisten Mutationen durch Deletionen vertreten.

rungen in Form von Deletionen oder Insertionen.

Die globale Analyse der verschiedenen Längen von Insertionen und Deletionen verlangt nach einer detaillierten Betrachtung der einzelnen Mutationen. Anders als bei der Mutagenese durch eine einzelne Nuklease, bei der in den allermeisten Fällen nur ein einzelnes bp inseriert war, kam es bei den gepaarten Nickasen zu größeren Veränderungen, die sich eingehender untersuchen lassen.

Um einen besseren Einblick in die verschiedenen Möglichkeiten zu bekommen, mit denen Muta-

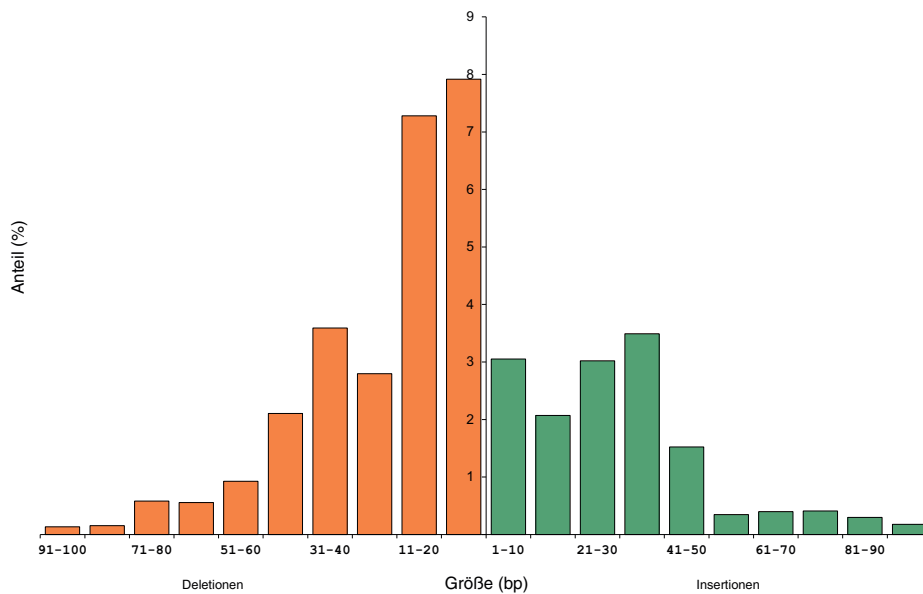


Abbildung 3.11: Verteilung der Größen von Insertionen und Deletionen nach Induktion von NHEJ durch gepaarte Nickasen. Aufsummiert bilden Deletionen 26,1 % der *Reads*, Insertionen 11,9 %. Insgesamt sind sowohl Insertionen als auch Deletionen deutlich größer als bei DSB Induktion mit einer Cas9 Nuklease (Abbildung 3.3). Deletionen von mehr als 100 bp machen 0,04 % aus, Insertionen über 100 bp 0,2 %.

tionen als Folge des induzierten NHEJ auftreten, wurde aus dem gesamten Datensatz zunächst ein reduzierter Datensatz erstellt. Dazu wurden zufällig 250 *Reads* aus der Gesamtheit der 72.187 *Reads* entnommen. Dieser reduzierte Datensatz erlaubte eine einzelne Betrachtung der Sequenzen. Zunächst konnte festgestellt werden, dass von den 250 *Reads* 107 eine Mutation im relevanten Bereich zwischen den PAMs zeigten (Abbildung 3.12). Das entspricht einer Frequenz von 42,8 % und zeigt, dass es sich um eine repräsentative Auswahl handelte, da die Frequenz nah an der relativen Menge mutierter *Reads* des gesamten Datensatzes liegt (41,7 %). Von den 107 Mutationen stellten 29 (27,1 %) Deletionen dar, welche die *upstream* sgRNA Zielsequenz betrafen, 22 (20,6 %) lagen in der *downstream* Zielsequenz. Die Größen der deletierten Abschnitte bewegten sich von 1 bp bis über 100 bp und es war keinerlei Präferenz für eine der beiden sgRNA Zielsequenzen zu erkennen. Insertionen verteilten sich auf 6 *upstream* (5,6 %), 16 *downstream* (15 %) und 8 lagen zwischen den beiden Zielsequenzen (7,5 %). Durch die mitunter hohe Größe von Insertionen, ließ sich deren Ursprung bestimmen. In allen zu beobachtenden Fällen stammte die Sequenz von der unmittelbaren Umgebung ihres Insertionsortes ab, sorgte also für die Bildung von Tandemwiederholungen (Abbildung 3.12B). In einigen Fällen lagen auch mehrere Insertionen der gleichen Sequenz am Insertionsort vor, sodass es zur Ausbildung von drei oder mehr Wiederholungen kam.

Abbildung 3.12: NHEJ Ereignisse im reduzierten Datensatz der Induktion gepaarter SSBs. Gezeigt sind alle individuellen Ereignisse, die sich im Datensatz finden lassen, aufgeteilt in Deletionen (**A**), Insertionen (**B**) und kombiniert auftretende Insertionen/Deletionen (**C**). Deletionen treten in variierenden Größen von wenigen bis zu 100 und mehr bp auf, es ist dabei keine Präferenz auf eine der sgRNA Zielsequenzen zu erkennen. Auffällig bei den Insertionen ist die Tatsache, dass sich die inserierte Sequenz (unter dem *Read*) immer der Umgebung ihres Insertionsortes (*) zuordnen lässt. Zum Teil sind die Abschnitte auch mehrfach hintereinander inseriert.

3.4.1 Nachweis hereditärer Mutationsereignisse als Folge gepaarter SSB Induktion

Ein bedeutender Schritt für die biotechnologische Nutzung von gepaarten Nickasen in der Herstellung neuer Pflanzenlinien ist die Vererbung der erhaltenen Mutationen in die nächste Generation. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch die durch gepaarte SSBs erhaltenen Mutationen in *A. thaliana* vererbt werden können. Dazu wurden 30 Primärtransformanten (T1-Generation) bis zur Samenreife kultiviert und die Samen der einzelnen Pflanzen getrennt geerntet. Die Samen wurden auf Selektionsmedium ausgebracht und gewachsene Pflanzen nach zwei Wochen Inkubation gezählt. Korrekt 3:1 segregierende Linien (also 75 % überlebende, 25 % tote Pflanzen) wurden als *single-locus* angesehen, die T-DNA wurde also nur an einer Stelle des Genoms eingebaut. Von den verwendeten Linien konnten 20 als *single-locus* identifiziert werden (siehe Abschnitt 8.4 im Anhang). Jeweils 20 Samen von jeder dieser Linien wurden auf GM ohne Selektionsmarker ausgebracht und nach zwei Wochen Wachstum wurde mittels Schnellpräparation einzeln von den Pflanzen DNA isoliert. Mit T-DNA spezifischen *Primern* (SS48/SS153) wurde per PCR die Präsenz des Nickase-Transgens überprüft. Von den 400 getesteten Pflanzen zeigten 121 keine PCR Bande (30,25 %), hatten also die T-DNA durch Segregation bereits verloren. Zur Analyse des *RTEL1* Locus in diesen Pflanzen wurde für jede Pflanze ein weiteres PCR Fragment generiert (Primer SS184/SS185), das den relevanten Bereich mit den sgRNA Zielsequenzen abdeckte, aufgereinigt und Sanger-sequenziert. Das PCR Produkt konnte für 78 Pflanzen generiert und erfolgreich sequenziert werden. Die Auswertung der Sequenzen ergab für 36 Pflanzen die WT Sequenz, 42 zeigten ein heterogenes Chromatogramm (Abbildung 3.13A), waren also entweder heterozygot im Bezug auf eine Mutation, oder homozygot aber heteroallelisch mutiert (transheterozygot).

Um exemplarisch zu zeigen, dass sich tatsächlich heterozygote oder heteroallelische Mutationen finden lassen, wurden einige Pflanzen noch weiter analysiert. Von einer Pflanze (#16-16) wurde das zuvor generierte PCR Produkt per TA-Klonierung in pGEM®-T-Easy eingebracht und in *E. co-*

Ergebnisse

li transformiert. Aus vier gewachsenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert und anschließend sequenziert. Dabei ergab sich für eine Sequenzierung die wildtypische Sequenz von *RTEL1*, die anderen drei Sequenzen wiesen eine Deletion von 27 bp im Bereich der Zielsequenz der *upstream* sgRNA auf (Abbildung 3.13B).

Die heterogenen Sequenzier-Chromatogramme weiterer Pflanzen wurden mit dem Programm Poly Peak Parser analysiert (Hill *et al.*, 2014, Abbildung 3.13). Dabei wurde die WT Sequenz als Referenz vorgegeben und die entsprechenden Ausschläge, die der Referenz zugeordnet werden können, aus dem Chromatogramm entfernt, sodass die Sequenz des mutierten Allels identifiziert werden kann. Auf diese Weise konnte die Genotypisierung der ausgewählten Pflanzen direkt aus der heterogenen Sequenzierung erfolgen (Abbildung 3.13B). So wurde im Fall der Pflanze #2-3 die Insertion eines Adenins in der *upstream* Zielsequenz festgestellt, für die Pflanzen #6-8, #8-10 und #23-11 handelte es sich um größere Insertionen von 22 bis 39 bp. Wieder war dabei die Duplikation der benachbarten Sequenz zu beobachten, sodass es zur Ausbildung von Tandem-Wiederholungen kam.

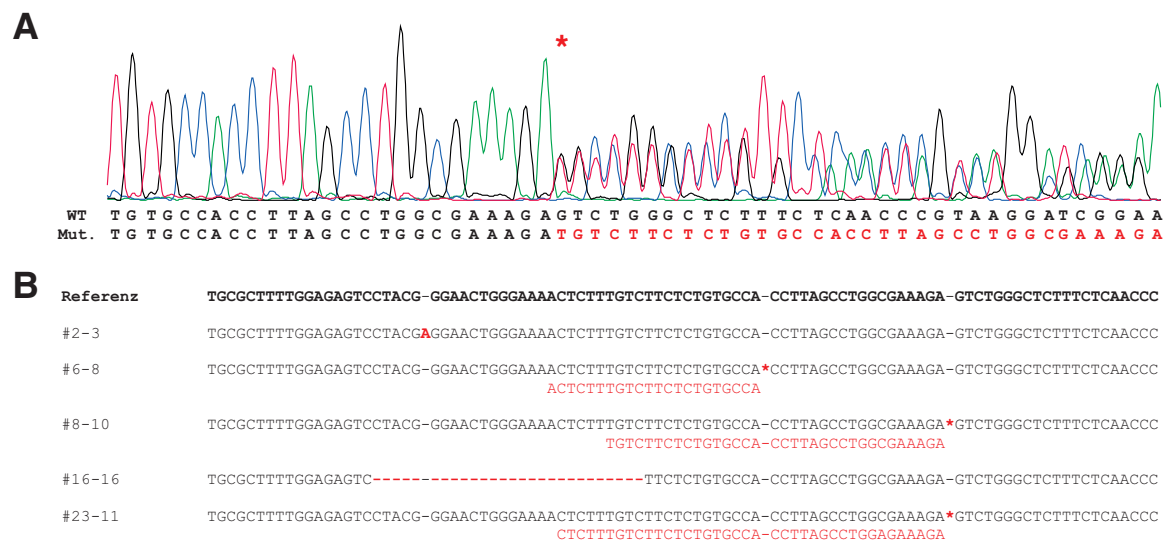


Abbildung 3.13: Beispiele erblicher Mutationen als Folge gepaarter SSBs. **A** Heterogenes Chromatogramm einer Sanger-Sequenzierung (Pflanze #8-10). Ab der markierten Position sind pro Position 2 Ausschläge zu sehen, was auf die Präsenz von 2 Allelen hindeutet. **B** Exemplarisches *Alignment* der mutierten Allele ausgewählter Pflanzen. Durch Poly Peak Parser (#2-3, #6-8, #8-10 und #23-11) lässt sich das Chromatogramm in WT Sequenz und mutiertes Allel aufteilen. Im Fall der Pflanze #16-16 wurden die Allele durch TA-Klonierung mit anschließender Sequenzierung der isolierten Plasmide ermittelt.

Diese detailliert genotypisierten T2 Pflanzen wurden schließlich bis zur Samenreife kultiviert und

das T3 Saatgut zur Kontrolle auf Selektionsmedium ausgebracht. In keinem Fall konnten keimende Pflanzen gefunden werden, was bestätigt, dass bereits die T2 Mutterpflanze keine T-DNA mehr enthalten hatte, es sich somit tatsächlich um stabil vererbte Mutationen handelte.

3.5 Systematische Analyse von Genomveränderungen als Folge gepaarter SSBs

Da die Induktion von NHEJ durch gepaarte Nickasen zu unerwartet komplexen Veränderungen im angesteuerten Locus führten, sollte dieser Ansatz noch vertieft werden. Dadurch sollten Hinweise auf die Mechanismen aufgedeckt werden, welche der Veränderung von Loci als Folge von DNA Schäden zu Grunde liegen.

Für eine systematische Analyse wurden zunächst drei endogene Loci von *A. thaliana* aus verschiedenen genomischen Bereichen ausgewählt (Abbildung 3.14A). Zum einen wurde *ADH1* (*Alcohol dehydrogenase 1*, AT1G77120) als codierender Bereich eines Gens gewählt, ein intergenischer Abschnitt von etwa 8 kb zwischen den Loci AT2G22620 und AT2G22630, sowie ein Abschnitt im Heterochromatin nahe des Centromers von Chromosom 3. Für den Abschnitt im Heterochromatin wurde basierend auf den Daten von Zhang *et al.* (2006) überprüft, dass es sich um einen Bereich mit hohem Methylierungsgrad handelte. Für alle drei Loci wurden je drei Konstrukte für gepaarte Nickasen entworfen und kloniert, bei denen die Abstände der SSBs im Abstand von etwa 20, 50 oder 100 bp induziert werden sollten (Abbildung 3.14B, Oligonukleotide SS186-SS193 für *ADH1*, SS202-SS209 intergenisch, SS212-SS219 Heterochromatin). Zusätzlich wurden Zielsequenzen ausgewählt, die in den drei Loci in vergleichbaren Abständen SSBs auf dem selben DNA-Strang einführen sollten (siehe Abschnitt 3.5.2, Oligonukleotide SS194-SS201 für *ADH1*, SS204-SS211 intergenisch, SS214-SS221 Heterochromatin).

3.5.1 Induktion von SSBs auf beiden DNA-Strängen

Die entsprechenden Konstrukte wurden kloniert und stabil in *A. thaliana* Pflanzen transformiert. Anschließend erfolgte eine *Deep sequencing* Analyse der Bereiche, in denen die SSBs induziert wer-

Ergebnisse

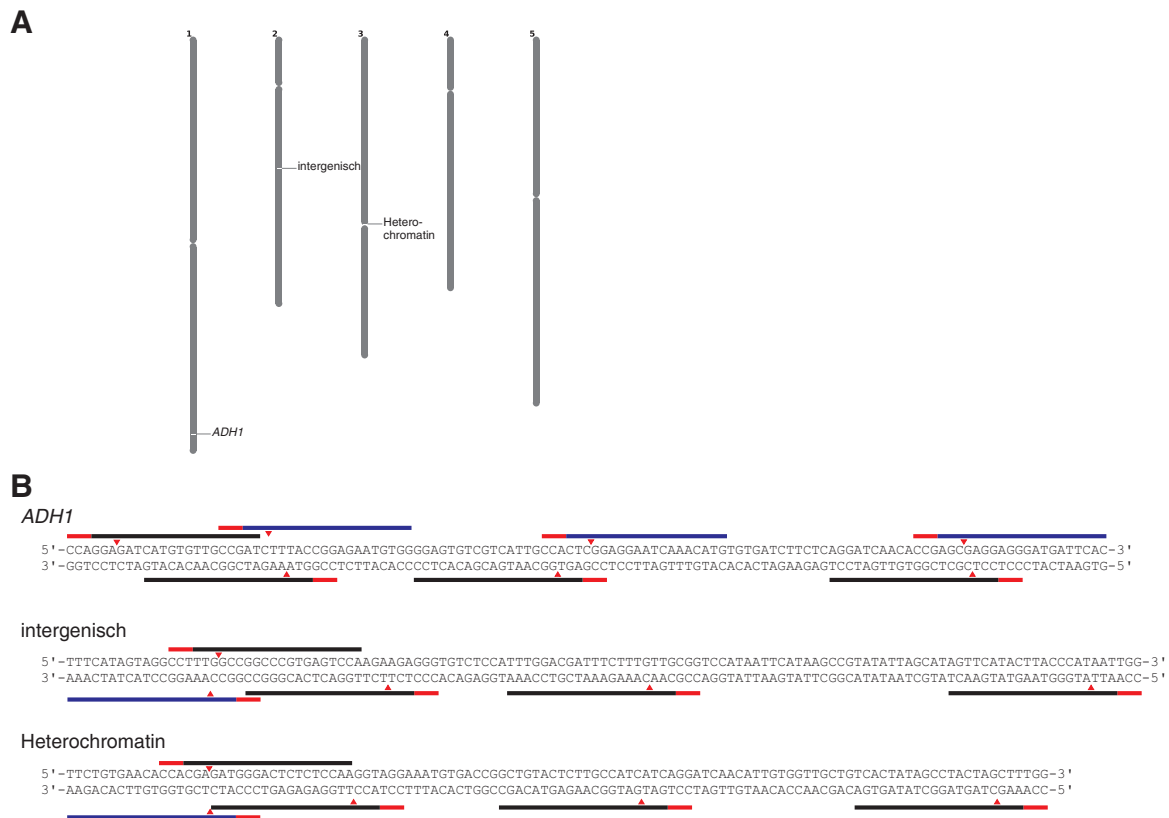


Abbildung 3.14: Auswahl von Loci und Planung von Zielsequenzen zur Analyse von gepaarten SSBs. A *ADH1* diene beispielhaft als Abschnitt innerhalb eines Gens, auf Chromosom 2 konnte ein intergenischer Abschnitt von etwa 8 kb identifiziert werden. Der dritte ausgewählte Bereich lag im Heterochromatin am Centromer von Chromosom 3. **B** Es wurde jeweils 3 Paare an sgRNA Zielsequenzen ausgewählt, durch die SSBs in Abständen von etwa 20, 50 und 100 bp verursacht werden sollten. Zusätzlich sind die Zielsequenzen markiert, die für die Induktion von SSBs auf dem selben DNA-Strang ausgewählt wurden (blau). Im Fall von *ADH1* wurde dann die sgRNA auf dem *sense*-Strang jeweils mit einer der blau markierten sgRNAs kombiniert, für die beiden anderen Loci lagen die sgRNAs auf dem *antisense*-Strang

den sollten (Primer SS280-SS282 / SS286 für *ADH1*, SS287-SS289 / SS293 intergenisch, SS294-SS296 / SSS300 Heterochromatin). Die erhaltenen, für die Analyse herangezogenen *Read* Anzahlen sind in Abschnitt 8.5 aufgeführt.

Die Ergebnisse der Auswertung nach unterschiedlichen Mutationen pro Position sind in den Abbildungen 3.15 bis 3.17 dargestellt. Auffällig ist dabei zunächst die Tatsache, dass sich für einen Abstand von 20 bp zwischen den SSBs nur in sehr geringem Maß NHEJ Ereignisse feststellen lassen. Die bestimmten Mutagenesefrequenzen liegen hier bei 2,2 % für *ADH1*, 6,1 % intergenisch und 1,3 % im Heterochromatin. Für den Abstand von 50 bp zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie zuvor für *RTEL1* (Abschnitt 3.4). Die Frequenzen liegen hier bei 63,1 % (*ADH1*), 30,4 % (intergenisch) und

Ergebnisse

27,7 % (Heterochromatin). Die Charakteristik der Verteilung von Mutationen ähnelt sich ebenfalls. Im Bereich der Zielsequenzen der sgRNAs sind die meisten Mutationen zu finden, pro Position handelt es sich häufig um Deletionen. Bei 100 bp Abstand zwischen den SSBs bleiben die Frequenzen für den intergenischen Bereich mit 26,6 % und im Heterochromatin mit 30,5 % auf einem ähnlichen Niveau. Für *ADH1* liegt die Frequenz noch einmal höher bei 77 %. An der Verteilung entlang der Sequenzen ändert sich wenig; die Maxima liegen in größerem Abstand zueinander nach wie vor im Bereich der sgRNAs, der überwiegende Anteil der Mutationen pro Position sind auch hier Deletionen.

Die Größenverteilung für Deletionen und Insertionen ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Es zeigt sich, dass vor allem die Größe von Deletionen mit höherem Abstand der SSBs zunimmt. Besonders auffällig ist bei *ADH1* für den Abstand von 100 bp die Präsenz einer Deletion von 105 bp Größe. Diese macht 17,6 % aller *Reads* in diesem Datensatz aus. Die Besonderheit dieser Mutation wird in Abschnitt 4.5.1 zusammen mit anderen Ereignissen eingehender diskutiert. Insertionen scheinen beim Abstand der SSBs von 50 bp am häufigsten aufzutreten, die Größe liegt dabei meist unter 50 bp.

Die Betrachtung einzelner Insertionen ist für *ADH1* in Abbildung 3.19 dargestellt, die Daten für die beiden weiteren Loci sind im Anhang zu finden (Abschnitt 8.5). Für die Darstellung wurden aus den Datensätzen jeweils die längsten Insertionen ausgewählt. Für die Distanz von 20 bp sind keine Ergebnisse dargestellt, da zum einen die Frequenz an Mutationen insgesamt sehr gering war, zum anderen wurde eine Mindestgröße von 10 bp für Insertionen angesetzt, um den Ursprung der Insertion sicher bestimmen zu können. Diesem Kriterium entsprach keiner der *Reads* im Datensatz für das Konstrukt ADH-o20.

Passend zu den Ergebnissen im *RTEL1* Locus (Abbildung 3.12) ließen sich auch hier die Insertionen der unmittelbaren Umgebung des Insertionsortes zuordnen. Letzterer lag stets zwischen den beiden induzierten SSBs, allerdings nicht exakt an der Position der Schnittstelle der Cas9 Nickase. Obwohl sich die insgesamt Länge der dargestellten Insertionen abhängig von der Distanz der SSBs nicht unterschied, handelte es sich bei der geringeren Distanz in allen Fällen um mehrfache (in der Regel dreifache) Insertion der nahezu selben Sequenz kürzerer Länge. Im Fall von 100 nt Distanz lag häufig die inserierte Sequenz nur einmal vor, dafür wies diese eine größere Länge auf.

Ergebnisse

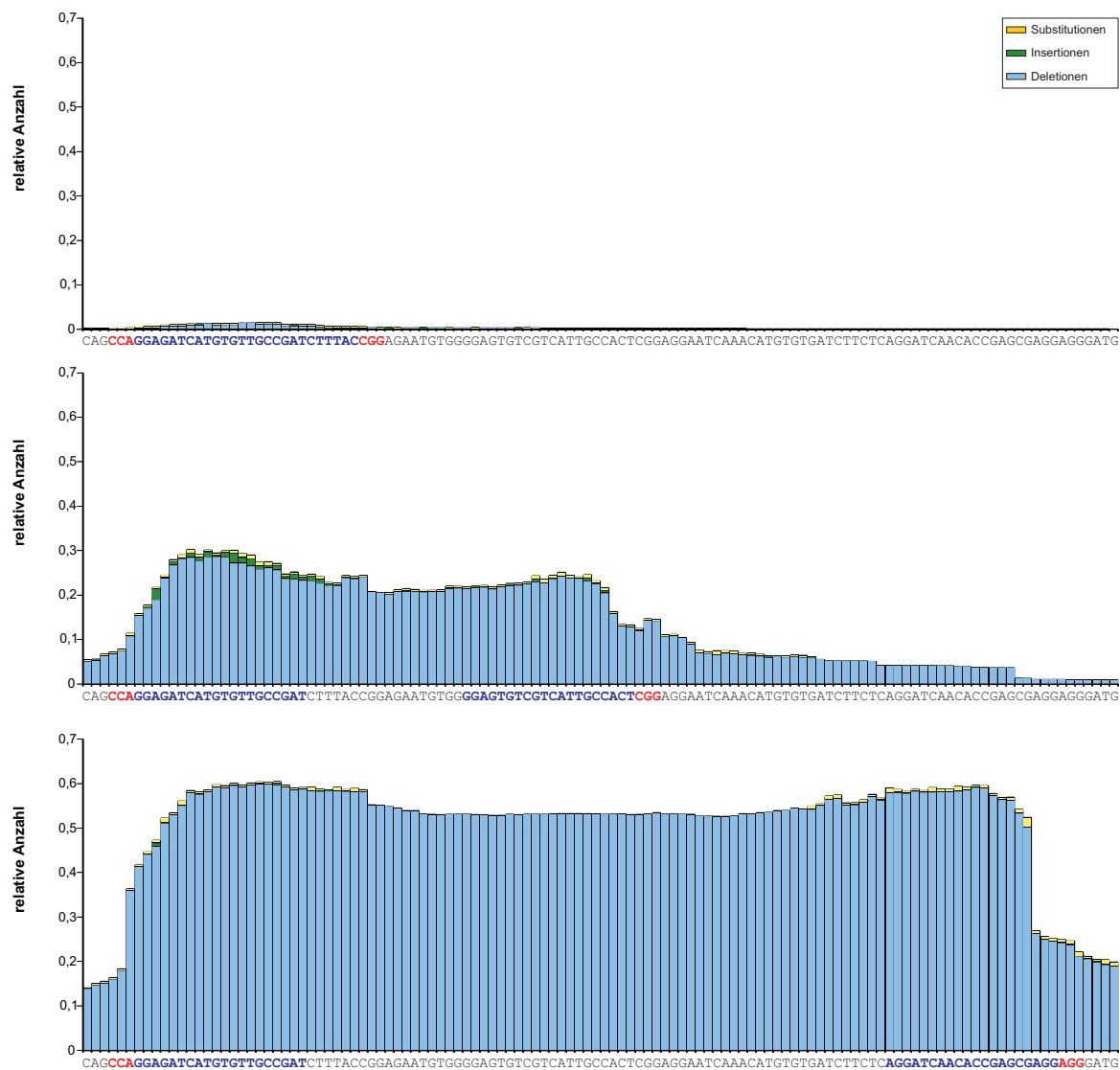


Abbildung 3.15: Deep sequencing Analysen gepaarter SSBs in *ADH1*. Für den Abstand von 20 bp zwischen den SSBs (erstes Diagramm) findet kaum Induktion von Mutationen statt. Für die Distanz von 50 bp (zweites Diagramm) finden sich die meisten Mutationen im Bereich der Bindestellen der sgRNAs, es handelt sich zumeist um Deletionen. Auffällig für die Distanz von 100 bp ist die Tatsache, dass die Frequenz mutierter *Reads* mit über 60 % deutlich höher ausfällt als bei den anderen beiden Loci.

Ergebnisse

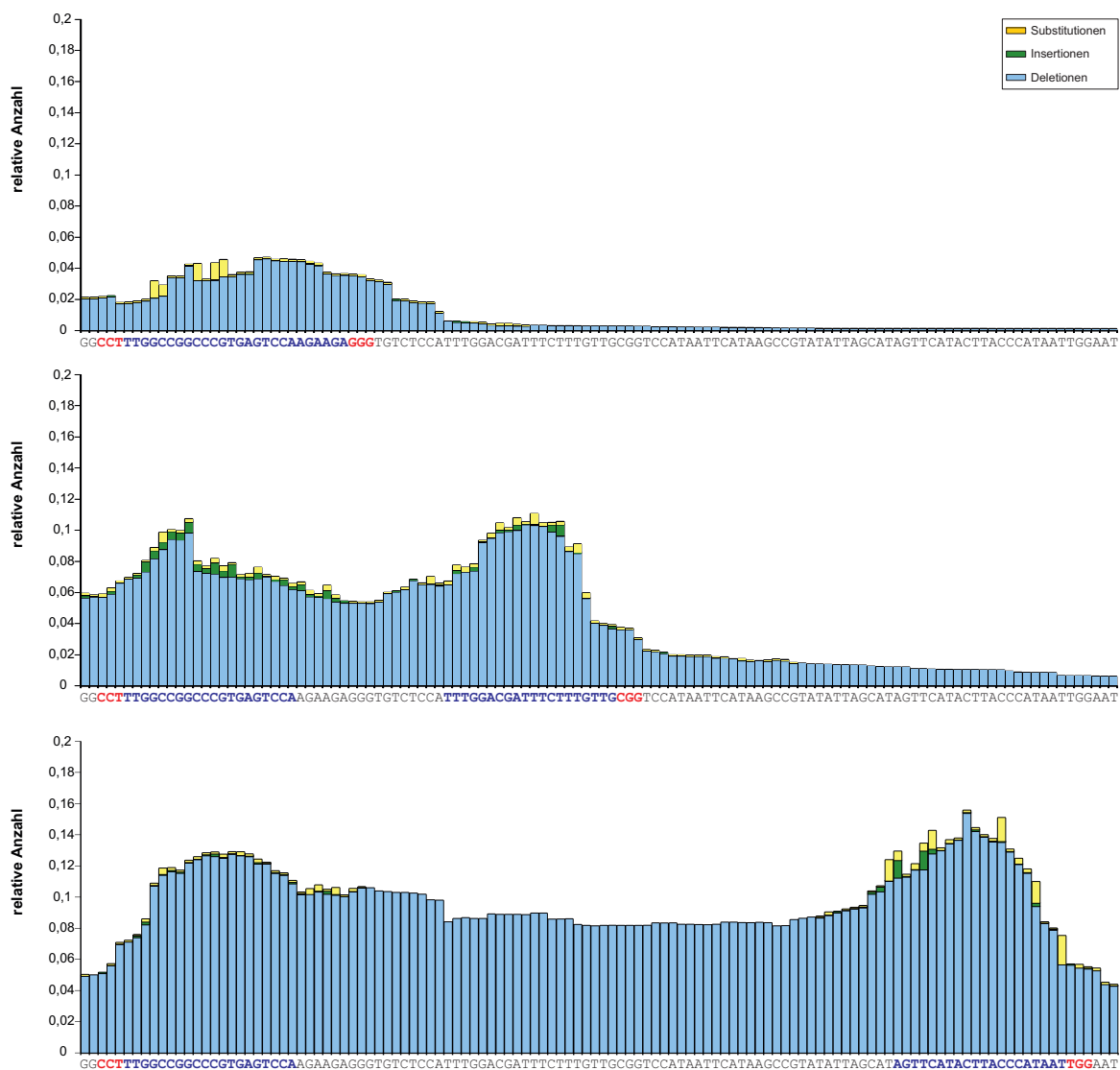


Abbildung 3.16: *Deep sequencing* Analysen gepaarter SSBs im intergenischen Bereich. Das Bild ähnelt im Grundsatz dem für *ADH1*, einzig die mit etwa 5 % etwas höhere Induktion von Mutationen bei der Distanz von 20 bp fällt hier deutlich auf.

Ergebnisse

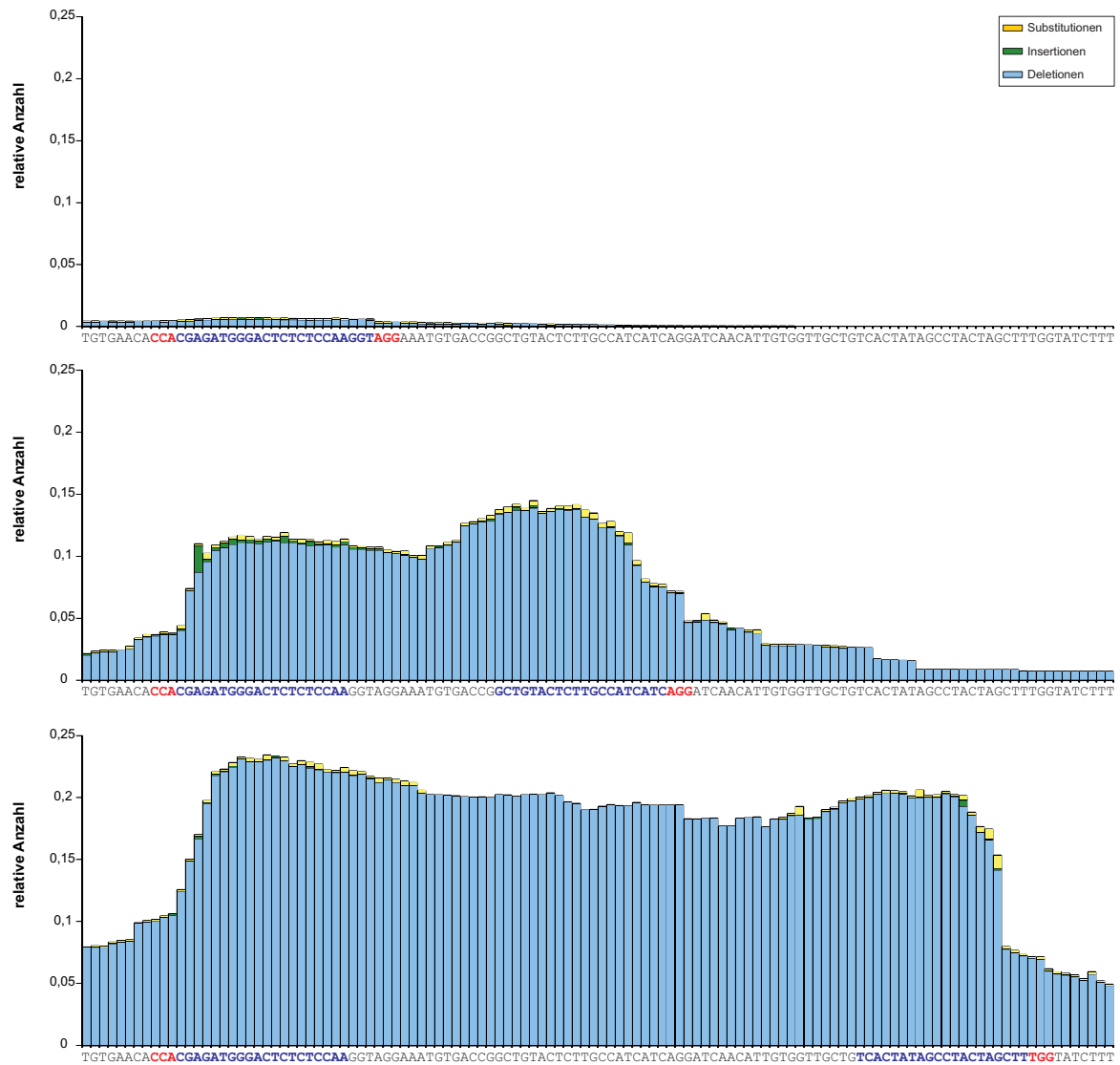


Abbildung 3.17: Deep sequencing Analysen gepaarter SSBs im Heterochromatin. Auch hier gibt es beim geringsten Abstand kaum Mutationen, die höheren Distanzen zeigen insgesamt eine vergleichbare Mutagenesefrequenz, wobei der betroffene Bereich mit der Distanz der sgRNA Zielsequenzen zueinander korreliert.

Ergebnisse

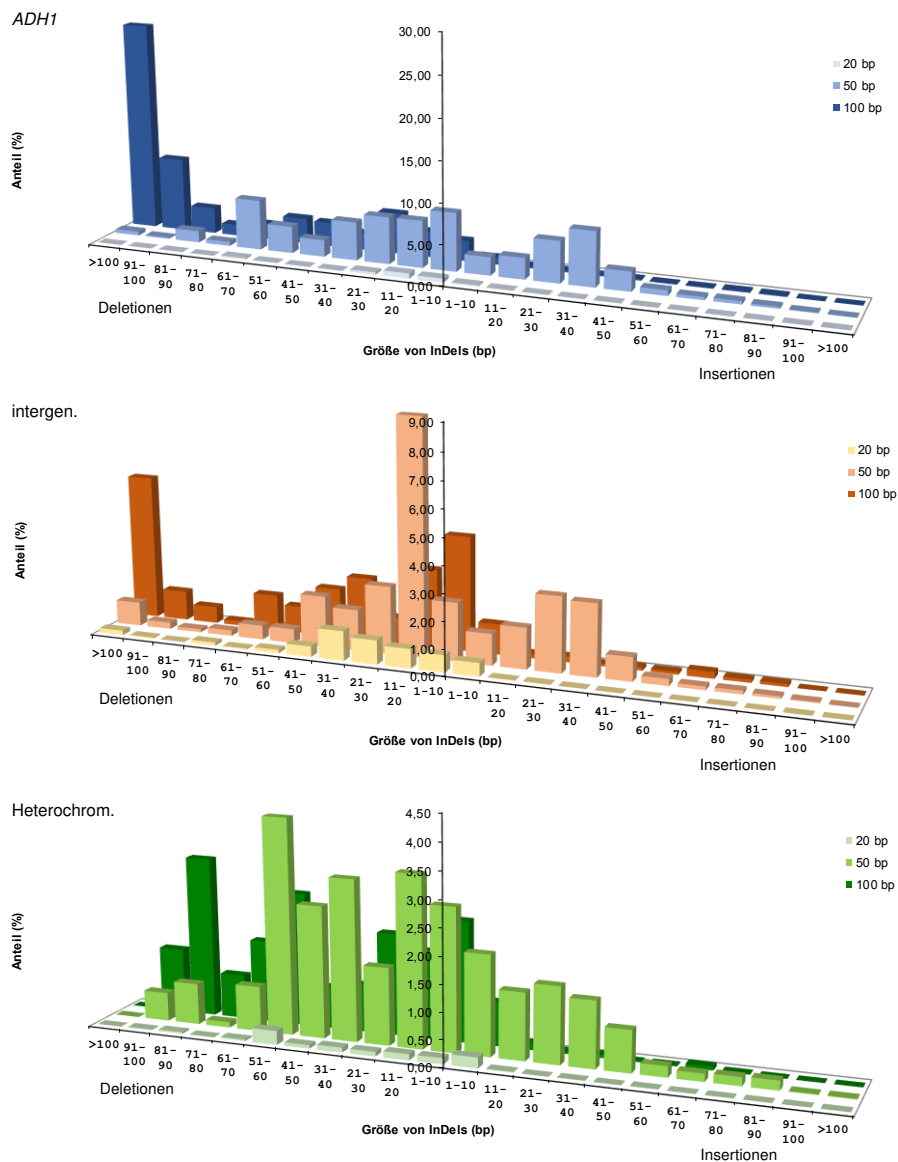


Abbildung 3.18: Größen von Mutationen nach gepaarten SSBs auf beiden DNA-Strängen. Mit steigendem Abstand der SSBs steigt vor allem die Größe von Deletionen. Insertionen treten vor allem beim Abstand von 50 bp auf und erreichen dann in der Regel Größen von bis zu 50 nt. Die stark überrepräsentierte Fraktion von Deletionen > 100 bp in *ADH1* wird in Abschnitt 4.5.1 diskutiert.

3.5.2 Induktion von SSBs auf dem selben DNA-Strang

Die für die Induktion von SSBs auf dem selben DNA-Strang ausgewählten sgRNAs Zielsequenzen wurden entsprechend kloniert und in *A. thaliana* eintransformiert. Erhaltene Primärtransformanten wurden der *Deep sequencing* Analyse unterzogen, die Ergebnisse gibt Tabelle 3.1 wieder (Primer

Ergebnisse

ADH1 Referenz 50 bp Distanz Read ID	Sequenz
JN35DQI01D0G30	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG GTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01AZAIW	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG CCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01B2F0M	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG GTTGCC
JN35DQI01C2APR	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG ACTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01CFVET	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TTACCGGAGAATGTG
JN35DQI01BRKZS	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01C3LKC	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TGTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01DQXSR	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01E0D3Q	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG CGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01E0D3Q	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG GGGAGTGTG
JN35DQI01E0D3Q	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG GATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01DEUZW	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01C8R3P	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG CGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01CU3D3	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01E1UPD	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01A6T0N	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01BRQ81	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG CGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01EN0R9	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01DSV29	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG GTTGATCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01DPP15	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG TTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
JN35DQI01CDVK8	CAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG GTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCGTATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG

Abbildung 3.19: Insertionen für die Konstrukte ADH-o50 und ADH-o100. Der Ort der Insertion ist jeweils markiert (*), die inserierte Sequenz ist darunter ihrem passenden Ursprung zugeordnet. Zeilenumbrüche bedeuten eine Fortsetzung der Insertion mit einer weiteren Duplikation, die wiederum ihrem Ursprung zugeordnet ist. In allen Fällen lässt sich der Ursprung der Insertion auf die unmittelbare Umgebung des Insertionsortes bestimmen. Im Fall der kürzeren Distanz zwischen den SSBs ist die Länge der Duplikation geringer, allerdings sind dann immer mehrere Wiederholungen der gleichen oder nahezu gleichen Sequenz inseriert. Bei 100 bp Abstand ist dies nur einmal der Fall, dafür sind die duplizierten Abschnitte entsprechend länger.

Ergebnisse

SS283-SS286 für *ADH1*, SS290-SS293 intergenisch, SS297-SS300 Heterochromatin).

Insgesamt lagen kaum Veränderungen vor, für fast alle Konstrukte liegen die Anzahlen von sowohl Deletionen als auch Insertionen unter 1 % und in fast allen Fällen zeigen sich minimal mehr Deletionen als Insertionen. Lediglich der Wert für die Deletionen beim Konstrukt Int-s20, also SSBs im intergenischen Bereich im Abstand von 20 bp, liegt mit über 4 % etwas höher.

Tabelle 3.1: Deep sequencing Ergebnisse von gepaarten SSBs auf einem DNA-Strang. Angegeben sind jeweils die Werte nach Filterung und Auswertung durch CRISPResso.

Konstrukt	Reads	% Deletion	% Insertion
ADH-s20	13.462	< 0,01	0,25
ADH-s50	12.392	0,62	0,23
ADH-s100	10.654	0,65	0,28
Int-s20	19.613	4,36	0,48
Int-s50	12.786	0,12	0,27
Int-s100	19.379	0,44	0,4
Het-s20	12.697	0,41	0,19
Het-s50	14.794	0,32	0,23
Het-s100	17.818	< 0,01	0,41

Eine repräsentative Auswahl großer Deletionen in *ADH1* ist in Abbildung 3.20 dargestellt, für die beiden anderen Loci ist die Darstellung im Anhang zu finden (Abschnitt 8.5). Insgesamt sieht das Bild ähnlich aus, wie bei der Induktion von SSBs auf beiden DNA-Strängen. Mit größerem Abstand der SSBs lagen auch größere Deletionen vor, positioniert sind sie immer im Bereich der sgRNA Zielsequenzen. Dennoch waren Veränderungen grundsätzlich selten zu beobachten (siehe Tabelle 3.1), die meisten *Reads* wiesen keine Mutation auf.

```

ADH1-Referenz  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGGAGATCATGTGTTCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
20 bp Distanz
JN35DQ101CXU4G  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGGAGG-----ATGTGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
JN35DQ101CVPVR  AGGAGTGACTGATC-----ATGTGTTCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
JN35DQ101A4T9H  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGGAGATC-----TTTACCGGAGAATGTGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
50 bp Distanz
JN35DQ101AEL8P  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGG-----TCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
JN35DQ101EEPE5  AGGAGTGACTGATCTTC-----TCACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
JN35DQ101CQNEY  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGG-----TCACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
JN35DQ101B9J5J  AGGAGTGACTGTCTTCA-----ACCGGAGAATGTGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
JN35DQ101A1FSF  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGGAGATCATGTGTTCCG-----GGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
100 bp Distanz
JN35DQ101AIWCQ  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGG-----TGG
JN35DQ101BT65R  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGG-----TCACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG
JN35DQ101EY255  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGG-----AT-----TGATTCACGATGG
JN35DQ101BHF0E  AGGAGT-----AT-----TGATTCACGATGG
JN35DQ101BHQH  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGGAGATCATGTGTTCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGAGTG-----G
JN35DQ101C8NTD  AGGAGTGACTGATCTTCAGCCAGGAG-----ATGTGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGATGG

```

Abbildung 3.20: Deletionen für SSBs auf einem DNA-Strang in *ADH1*. Es zeigen sich insgesamt wenig Deletionen, die Größe korreliert jedoch mit dem Abstand der SSBs. Die Deletionen tauchen im Bereich der induzierten SSBs auf.

Um die Identität einzelner Insertionen zu überprüfen, wurden die *Reads* mit den längsten Insertio-

nen aus den Datensätzen extrahiert und im Detail betrachtet (Abbildung 3.21). Zwar handelt es sich insgesamt um extrem wenig Ereignisse, die eine große Insertion tragen, dennoch lassen sich einzelne *Reads* identifizieren und darstellen. Das Bild ist dabei ähnlich wie bei Insertionen nach SSBs auf beiden DNA-Strängen. Es kam immer zu Duplikationen, meist direkt der benachbarten Sequenz. In zwei Fällen stammte die Sequenz der Insertion auch von einem weiter entfernt liegenden Abschnitt, allerdings immernoch in der direkten Nähe des Insertionsortes und den induzierten SSBs. Eine eingehendere Diskussion der Entstehung dieser Ereignisse folgt in Abschnitt 4.5.1.

ADH1-Referenz CTT**CAGCCAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGAT**

Read ID JN35DQI01C1B5N

20 bp Distanz CTT**CAGCCAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGAT**
AATGTGGGGAGTGTCTG

50 bp JN35DQI01CM67K CTT**CAGCCAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTTTACCGGAGAAT*GTGGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGAT**
TTACCGGAGAAT

100 bp JN35DQI01D23FE CTT**CAGCCAGGAGATCATGTGTTGCCGATCTT*TA**CCCGGAGAATGTGGGGAGTGTCTGTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCACGAT
GATCATGTGTTGCCGATCTT

Int.-Referenz AAGTATCTGGTAATGCCTAATCACAACAGTATGTTTCATAGTAGGCCCTTTGGCCGGCCCGTGAGTCCAAGAAAGAGGGTGTCTCCATTTGGACGATTTCTTTGTTGCGGTCCATAATTCATAAGCCGTATATATTAGCATAGTTCATACTTACCCATAAT**TGGAA**

20 bp Distanz JN35DQI01CN686 AAGTATCTGGTAATGCCTAATCACAACAGTATGTTTCATAGTAGGCCCTTTGGCCGGCCCGTGAGTCCAAGAA*GAGGGTGTCTCCATTTGGACGATTTCTTTGTTGCGGTCCATAATTCATAAGCCGTATATATTAGCATAGTTCATACTTACCCATAAT**TGGAA**
GAGGGTGTCTCCATTTGGACGA

JN35DQI01BHNOE AAGTATCTGGTAATGCCTAATCACAACAGTATGTTTCATAGTAGGCCCTTTGGCCGGCCCGTGAGTCCAAGAA
CCCGTGAGTCCAAGAA

JN35DQI01EOQAE AAGTATCTGGTAATGCCTAATCACAACAGTATGTTTCATAGTAGGCCCTTTGGCCGGCCCGTGAGTCCAAGAAAGAGGGTGTCTCCATTTGGACGATTTCT*TTGTTGCGGTCCATAATTCATAAGCCGTATATATTAGCATAGTTCATACTTACCCATAAT**TGGAA**
GAGTCCAAGAAAGAGGGTGTCTCCATTTGGACGATTTCT

JN35DQI01CWRDF AAGTATCTGGTAATGCCTAATCACAACAGTATGTTTCATAGTAGGCCCTTTGGCCGGCCCGTGAGTCCA-----*TGTCTCCATTTGGACGATTTCTTTGTTGCGGTCCATAATTCATAAGCCGTATATATTAGCATAGTTCATACTTACCCATAAT**TGGAA**
AGTATCTGGTAATGCCTAATCACAACAGTA

JN35DQI01DY087 AAGTATCTGGTAATGCCTAATCACAACAGTATGTTTCATAGTAGGCCCTTTGGCCGGCCCGTGA-----*AGAGGGTGTCTCCATTTGGACGATTTCTTTGTTGCGGTCCATAATTCATAAGCCGTATATATTAGCATAGTTCATACTTACCCATAAT**TGGAA**
CGATTTCTTTGTTGCGGTCCATAATTCAT

50 bp JN35DQI01D5FDN AAGTATCTGGTAATGCCTAATCACAACAGTATGTTTCATAGTAGGCCCTTTGGCCGGCCCGTGAGTCCAAGAAAGAGGGTGTCTCCATTTGGACGAT*TTCTTTGTTGCGGTCCATAATTCATAAGCCGTATATATTAGCATAGTTCATACTTACCCATAAT**TGGAA**
GAGTCCAAGAAAGAGGGTGTCTCCATTTGGACGAT

Het.-Referenz TTGTTTCTTGTCTGTGAACACCAGAGATGGGACTCTCTCCAAGT**AGG**AAATGTGACCGCTGTACTCTTGCATCAT**AGG**ATCAACATTGGTGTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATCTTT

20 bp Distanz JN35DQI01CJLLB TTGTTTCTTGTCTGTGAACACCAGAGATGGGACTCTCTCCAAGT**AGG**AAATGTGACCGCTGTACTCTTGCATCAT**AGG**ATCAACATTGGTGTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATCTTT
GGACTCTCTCCAAGTAGGAAATG

Abbildung 3.21: Alignment der größten Insertionen nach gepaarten SSBs auf einem DNA-Strang. Für die jeweiligen Konstrukte sind alle Reads mit Insertionen von mehr als 10 bp dargestellt. In der Referenzsequenz sind die Zielsequenzen (inklusive PAM) markiert. Im Read ist die Position der Insertion markiert (*), die inserierte Sequenz ist jeweils darunter angegeben, passend zu dem Sequenzabschnitt, mit dem sie übereinstimmt. In allen Fällen hat die Insertion ihren Ursprung in der unmittelbaren oder näheren Umgebung. In zwei Fällen liegt zusätzlich eine kurze Deletion vor.

4 Diskussion

4.1 Etablierung eines CRISPR/Cas Systems in *Arabidopsis thaliana*

Die Möglichkeit von präzisen, zielgerichteten Veränderungen des Genoms begann zwar bereits in den 1990er Jahren mit dem ersten erfolgreichen Einsatz von I-SceI in Tabak (Puchta *et al.*, 1993), jedoch erst durch die Entwicklung der synthetischen Nukleasen war es möglich, auch gezielt endogene Loci zu manipulieren (Übersichten in Voytas, 2013; Puchta & Fauser, 2014). Auch wenn ZFNs bis heute zum Einsatz kommen, wurde der Einsatz synthetischer Nukleasen erst durch die Entwicklung der TALENs und die Möglichkeit, diese einfach und kostengünstig in großer Zahl herzustellen, einer breiten Masse zugänglich (Mahfouz *et al.*, 2011; Cermak *et al.*, 2011). Dies wurde vor allem dadurch begünstigt, dass sich neue Nukleasen automatisiert bioinformatisch entwerfen ließen, und ein wesentlicher Teil der bei ZFNs nötigen Aktivitätstests entfiel.

Den jüngsten Fortschritt im Bereich der synthetischen Nukleasen stellt die Entdeckung und Entschlüsselung des bakteriellen CRISPR/Cas Systems dar (Jinek *et al.*, 2012). Bereits kurz nach der *in vitro* Charakterisierung des molekularen Mechanismus der Nuklease Cas9 konnte gezeigt werden, dass sich das System auch in menschlichen Zellen zur Induktion von Mutationen und HR einsetzen lässt (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013b). Maßgeblich für den Erfolg von CRISPR/Cas basierten Systemen ist zum einen der einfache Aufbau: Statt eines künstlichen Fusionsproteins wie bei ZFNs und TALENs bestehen CRISPR/Cas basierte Nukleasen aus dem natürlichen Protein Cas9 und der chimären sgRNA. Dabei muss keine Veränderung des Proteins erfolgen, um die Nuklease auf eine neue Zielsequenz einzustellen. Anders als bei ZFNs und TALENs, bei denen durch teils aufwändige Klonierungen die DBD innerhalb des Proteins angepasst werden muss, wird die Spezifität von Cas9 einzig durch die sgRNA vermittelt. Da es sich hierbei um eine Zielerkennung durch direkte Basenpaarung handelt, kommt es auch nicht zu Positionseffekten oder anderen Interferenzen wie sie vor allem bei ZFNs, in geringem Ausmaß auch bei TALENs eine Rolle spielen. Damit gibt es bis auf die Präsenz des korrekten PAM auch keine direkten Voraussetzungen für die Zielsequenz der sgRNA. Tatsächlich wurde in der vorliegenden Arbeit zu keiner Zeit eine Software oder Datenbank benutzt, die eine Auswahl der Zielsequenz vornimmt. Die gewählten Zielsequenzen wurden grundsätzlich nur nach ihrer korrekten Lage zu einem PAM ausgesucht und zeigen trotzdem allesamt entsprechende Aktivität. Weiterhin gestaltet sich auch die Klonierung von sgRNAs denkbar

einfach, müssen doch lediglich zwei passende Oligonukleotide eingesetzt werden, die durch einfache Ligation das Expressionssystem für eine sgRNA komplettieren.

Der zweite Grund für den Erfolg von Cas9-basierten Nukleasen ist die hohe Zahl an Organismen, in denen das System funktioniert. Zwar handelt es sich um ein System, das seinen Ursprung in Bakterien und Archeen hat, jedoch wurde es auch in den verschiedensten eukaryotischen Organismen erfolgreich angewendet (DiCarlo *et al.*, 2013; Friedland *et al.*, 2013; Gratz *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2013). Mitte 2013 wurden die ersten Studien veröffentlicht, die auch die Anwendung in Pflanzen dokumentierten (Li *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013) und auch hier wurde das Anwendungsspektrum rasch auf zahlreiche Pflanzenspezies ausgeweitet.

Das in dieser Arbeit verwendete CRISPR/Cas System basiert auf einer für *A. thaliana* Codon-optimierten Version von Cas9 unter der Kontrolle eines konstitutiven pflanzlichen Expressionssystems (Fauser *et al.*, 2014). Die Wahl des Expressionssystems spielt für den Einsatz in Pflanzen eine wichtige Rolle. Um eine hohe Rate an DSB Induktion zu erhalten, muss eine hohe Expression gewährleistet sein (Duda *et al.*, 2014). Häufig wird für eine konstitutive Expression heterologer Proteine in Pflanzen der 35S Promotor des *Cauliflower mosaic virus* eingesetzt. Dieser wurde auch in mehreren Studien für die Expression von Cas9 benutzt (Feng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2014). Allerdings ist für diesen Promotor bekannt, dass er auch in Bakterien exprimiert wird (Assaad & Signer, 1990). Im Fall von Cas9 scheint eine Kontrolle durch den 35S Promotor nicht optimal zu sein, da es offenbar zu toxischen Effekten während der Kultur der zur Pflanzentransformation benutzten Agrobakterien kommen kann (Zhou *et al.*, 2014). Eine Lösung für diesen Umstand kann neben der in dieser Arbeit gewählten Benutzung eines anderen Promotors auch das Einführen eines pflanzlichen Introns in den Cas9 ORF darstellen (Li *et al.*, 2013)

Die zweite Komponente des verwendeten CRISPR/Cas Systems, die sgRNA, wird im hier beschriebenen System vom U6-26 Promotor von *A. thaliana* kontrolliert. Diese Klasse von Promotoren rekrutiert zur Transkription RNA Polymerase III, deren Aufgabe die Expression von kurzen RNAs ist. Der gewählte U6-26 Promotor zeigte in Expressionsanalysen durch Li *et al.* (2007) die höchste Expression der dort analysierten U6-Promotoren. In den Konstrukten anderer Arbeitsgruppen kamen auch U6-1 von *A. thaliana*, U6.1 und 2 von Reis oder die eng verwandten U3-Promotoren mit meist vergleichbarem Erfolg zum Einsatz (Li *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015).

Für eine einfache und schnelle Herstellung von Cas9 Konstrukten wurden in dieser Arbeit mehrere Varianten kloniert. Zum einen wurde ein *Gateway*-basiertes Klonierungssystem erstellt, das die Klonierung einer neuen Nuklease innerhalb einer Woche in zwei effizienten Klonierungsschritten ermöglicht. Daneben wurden die beiden Cas9 Nickasen D10A und H840A im gleichen Vektorsystem etabliert, sodass auch hier eine schnelle Herstellung von Konstrukten möglich ist. Basierend auf den Nickase-Konstrukten wurde das Klonierungssystem dahingehend erweitert, dass die Produktion von gepaarten Nickasen zur Induktion von koordinierten SSBs möglich wurde. Dazu wurde lediglich ein weiterer Klonierungsschritt in den Ablauf integriert. Die hier beschriebenen Vektoren finden bereits in weltweit über 160 Arbeitsgruppen vor allem als Werkzeug zur zielgerichteten Mutagenese Verwendung.

4.2 Analyse von NHEJ als Folge von DSBs und SSBs

Um eine umfassende Aussage über die möglichen Ergebnisse von NHEJ induzierter Mutagenese zu erhalten, wurde ein *Amplicon deep sequencing* mittels NGS durchgeführt. Dabei fiel die Wahl der Sequenzieretechnologie auf Roche 454. Grund dafür ist die Tatsache, dass diese Technologie eine große Leseweite von 400 - 500 bp pro *Read* bietet (Frey *et al.*, 2014). Dies war für die beschriebenen Versuche von großer Bedeutung, da im Vorfeld nur sehr beschränkt Aussagen über die zu erwartenden Mutationen gemacht werden konnten. Vergleichbare Analysen lagen zu diesem Zeitpunkt nur für andere Organismen vor (Mali *et al.*, 2013b). Im Fall sehr großer Insertionen oder auch Deletionen hätten diese mit kürzeren Leseweiten, wie sie beispielsweise die HiSeq-Technologie von Illumina bietet, unter Umständen nicht detektiert werden können. Ebenfalls von großer Bedeutung bei der Auswahl der Plattform war die geringe Fehlerrate von 454 in einzelnen *Reads*, um auch sehr gering repräsentierte Mutationen detektieren zu können.

Die Induktion von NHEJ durch die hier verwendete Cas9 Nuklease führte in den meisten Fällen zur Insertion eines Basenpaars 3 bp entfernt des PAM. Damit entspricht die Position der detektierten Mutationen der exakten Stelle, an welcher der DSB durch Cas9 induziert wird (Jinek *et al.*, 2012). Auch Deletionen sollten an dieser Position am häufigsten auftreten, werden aber durch die Auswertung bedingt ein bis zwei bp weiter entfernt abgebildet, da sich die DSB-Induktion innerhalb eines Triplets aus Guaninen abspielt, und hier entsprechend eine falsche Anpassung der *Reads* ablaufen kann. Die Größe der Mutationen umfasst in den allermeisten Fällen nur ein bp, häufig

sind es Insertionen. Diese Beobachtung weicht von den Ergebnissen mit anderen sequenzspezifischen Nukleasen ab. Für ZFNs und TALENs wurden in Pflanzen häufiger Deletionen mehrerer bp beobachtet (de Pater *et al.*, 2009; Cermak *et al.*, 2011). Der Unterschied liegt wahrscheinlich darin begründet, dass diese Nukleasen durch die Architektur als Dimer einen versetzten Schnitt in die DNA einführen, also an den freien Enden Überhänge entstehen. Diese unterliegen offenbar einer stärkeren Prozessierung der zelleigenen Reparaturproteine, sodass es häufiger zur Ausbildung von Mikrohomologien kommen kann, was in der Folge zu aNHEJ und damit einhergehenden Deletionen führt (siehe Abschnitt 1.1.1). Im Gegensatz dazu führt Cas9 keinen versetzten Schnitt durch, stattdessen hinterlässt es Enden ohne Überhänge an der Schnittstelle. Diese scheinen weniger prozessiert zu werden, sodass die entstehenden Mutationen kleiner ausfallen.

Die erhaltenen Ergebnisse können auch durch weitere Studien bestätigt werden. Feng *et al.* (2014) identifizierten in *A. thaliana* ebenfalls 1 bp Insertionen als häufigste Form der Cas9-inuzierten Mutagenese. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte dieses Muster auch in Reis bestätigen (Zhang *et al.*, 2014). Auch in anderen Organismen sind die Ergebnisse dahingehend vergleichbar, etwa in menschlicher Zellkultur (Mali *et al.*, 2013b), Mäusen (Weber *et al.*, 2015) oder Affen (Niu *et al.*, 2014).

Zusammenfassend handelt es sich bei der hier verwendeten Cas9 Nuklease um ein hoch effizientes System zur zielgerichteten Mutagenese. Die erhaltenen Mutationen, die häufig 1 bp Insertionen oder Deletionen darstellen, sorgen für eine Verschiebung des Leserahmens und damit für den *Knock-out* des betroffenen Gens (Fauser *et al.*, 2014). In Pflanzen können die in somatischem Gewebe entstandenen Mutationen in die Keimbahn eingehen, und werden so in die nächste Generation vererbt, was das System auch für die gezielte Züchtung neuer Pflanzensorten interessant macht (Übersicht in Schaeffer & Nakata, 2015).

Neben der Untersuchung von NHEJ durch DSBs wurde in dieser Arbeit auch eine Cas9 Nickase in Bezug auf NHEJ untersucht. Dabei konnten keine Hinweise auf eine Mutagenese im Bereich der Zielsequenz der sgRNA festgestellt werden. Zwar lassen sich einzelne *Reads* im Datensatz finden, die eine Mutation aufweisen, doch sind diese sehr wahrscheinlich nur durch Sequenzierfehler entstanden. Es wird angenommen, dass SSBs in pflanzlichem Gewebe in der Regel mit hoher Präzision repariert werden, da der zweite, intakte DNA-Strang direkt zur Reparatur genutzt werden kann. Die genauen Mechanismen dabei sind zwar noch nicht ergründet, als wahrscheinlich gilt die Beteiligung von Basenexzisionsreparatur (BER), die beispielsweise auch für die Reparatur von Schäden

durch UV-Licht verantwortlich ist (Übersicht in Gill *et al.*, 2015).

Das hier erhaltene Ergebnis stimmt im Wesentlichen mit den Ergebnissen in anderen Organismen überein. Experimente mit Cas9-D10A in menschlichen Zellen zeigten jedoch, dass NHEJ zwar stark reduziert, jedoch nicht komplett unterdrückt ist (Mali *et al.*, 2013b; Li *et al.*, 2014). Für Pflanzen stellen die hier gezeigten Ergebnisse die ersten und aktuell einzigen Daten in diesem Zusammenhang dar. Der Unterschied kann mehrere Gründe haben, etwa verschiedene Enzymaktivitäten zwischen dem für Menschen Codon-optimierten hCas9 und dem hier verwendeten Cas9 für *A. thaliana*, oder auch mechanistische Unterschiede in der Reparatur der SSBs, die in Pflanzen möglicherweise präziser abläuft. Für letzteres spricht, dass auch mit anderen SSB induzierenden Enzymen in menschlichen Zellen ein geringes Maß an NHEJ nachgewiesen werden konnte (Certo *et al.*, 2011).

4.3 Induktion von HR durch Cas9-vermittelte DSBs und SSBs

Durch den Einsatz in geeigneten HR Reporterlinien wurde in der vorliegenden Arbeit die Induktion von HR durch Cas9 nachgewiesen. Die beiden verwendeten Reporter zeigen DSB Reparatur durch SSA beziehungsweise SDSA an. Die Cas9 Nuklease war in vergleichbarem Maß wie I-SceI in der Lage dazu, die HR zu induzieren. Interessanterweise wurde die höchste Rate an HR nach SSB Induktion durch die Cas9 Nickase erzeugt. Zusammen mit den Daten zur Induktion von NHEJ lässt sich ein entsprechendes Modell aufstellen (Abbildung 4.1). Sowohl für einen DSB als auch für einen SSB findet nur in geringem Maß HR statt. Vielmehr sind die bevorzugten Wege NHEJ beziehungsweise präzise SSB Reparatur wie etwa BER. Im Fall eines DSB führt NHEJ dabei häufig zur Ausbildung von Mutationen, besonders das hier verwendete Cas9 sorgt hocheffizient für zielgerichtete Mutagenese (siehe Abschnitt 3.2). Im Gegensatz dazu waren nach SSB Induktion keine Mutationen zu beobachten. Die unmittelbare Folge dieses Umstandes ist aber, dass die sgRNA Zielsequenz für die Nickase erneut zur SSB Induktion zur Verfügung steht, wohingegen Mutationen nach einem DSB eine weitere Erkennung der Zielsequenz verhindern. Dadurch erhöht sich insgesamt im Fall der Nickase die Wahrscheinlichkeit von HR, da nach jeder Reparatur ein weiterer SSB induziert werden kann. Erst ein HR Ereignis, das zu einer intakten *GUS* Sequenz ohne den *Spacer* führt, stellt einen stabilen Zustand dar, in dem keine weitere Nickaseaktivität vorhanden ist.

Bei der HR, die als Folge eines SSB auftritt, handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen klassi-

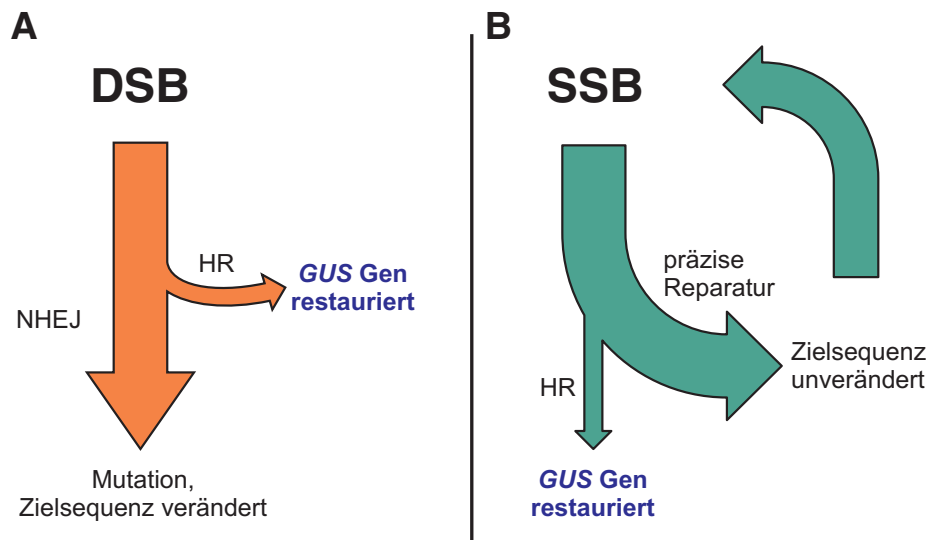


Abbildung 4.1: Modell für die unterschiedlich starke Rate an HR als Folge von DSBs und SSBs. **A** Die Induktion eines DSB durch eine Cas9 Nuklease führt in den meisten Fällen zu NHEJ, da es der bevorzugte Reparaturmechanismus für DSBs in somatischem Pflanzengewebe ist. Die dabei entstehenden Mutationen sorgen dafür, dass das Ergebnis ein fixierter Zustand ohne weitere DSB Induktion ist. In wenigen Fällen kommt es zu HR, was für die Restaurierung des *GUS* Gens und damit die Detektion über Färbung und Fluoreszenz sorgt. **B** Durch die Cas9 Nickase induzierte SSBs werden bevorzugt fehlerfrei repariert, auch hier kommt es nur in seltenen Fällen zu HR. Die Reparatur sorgt jedoch nicht für Mutationen, sodass sgRNA und Cas9 erneut einen SSB erzeugen können, durch den es zu HR kommen kann.

schen Mechanismus von SSA oder SDSA, da beide in ihrem Ablauf einen DSB voraussetzen (siehe Abbildung 1.2). Vorstellbar sind Mechanismen intrachromosomaler Rekombination, wie sie in Abbildung 4.2 dargestellt sind. In beiden Fällen wird der SSB im *antisense* Strang des *GUS* Gens induziert. Dadurch entsteht *downstream* ein freies 3'-Ende, welches freigesetzt werden kann und in den homologen Bereich des Reporterkonstruktes invadieren kann, sodass es zur Ausbildung eines *D-loops* kommt. Nach Neusynthese entlang der Homologie kommt es im Fall von IU.GUS zur Auflösung des *D-loops*, wenn der neu synthetisierte Strang mit dem Abschnitt des *GUS* Gens hybridisieren kann, der *upstream* vom *Spacer* liegt. Das freie 5'-Ende des SSB kann durch spezielle Exonukleasen wie FEN1 resektiert werden (Übersicht in Liu *et al.*, 2004). Im Fall von DGU.US kann das freie 3'-Ende in den *upstream* Bereich des *GUS* Gens invadieren und neu synthetisiert werden. Das dadurch verdrängte 5'-Ende muss ebenfalls durch Exonukleasen abgebaut werden, sodass eine Ligation der Enden möglich ist.

In beiden Modellen kommt es schließlich zur Ausbildung einer Struktur, bei der ein Abschnitt des *sense* Stranges nicht mit dem modifizierten *antisense* Strang hybridisiert. Dieser Abschnitt muss

schließlich abgebaut werden, denkbar ist hier beispielsweise für IU.GUS eine Reparatur über *long patch* BER, da es sich nur um einige nt handelt. Für beide Modelle ist auch eine Rekombination mit dem Schwesterchromatid möglich, allerdings scheint intrachromosomale Reparatur in Pflanzen allgemein bevorzugt zu sein (Roth *et al.*, 2012).

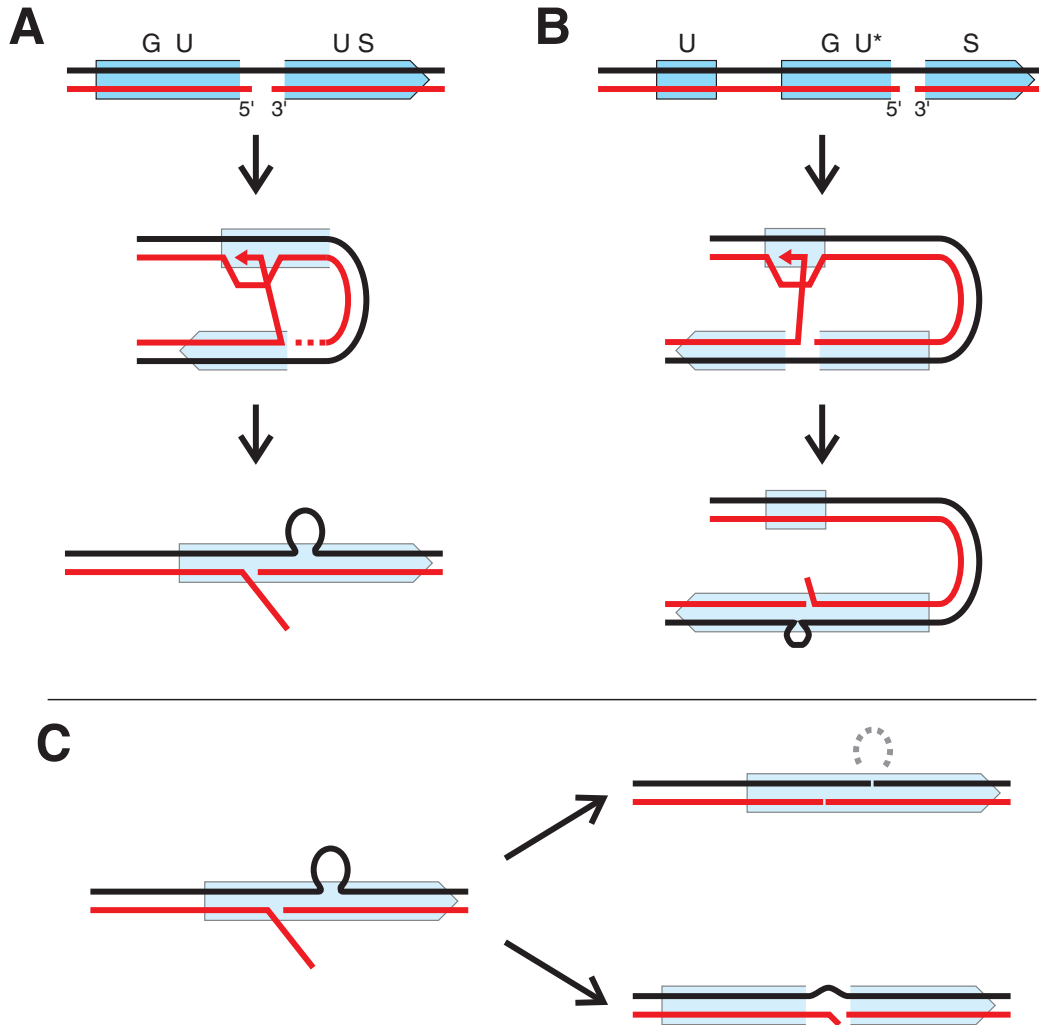


Abbildung 4.2: Modelle für SSB induzierte HR in den Reporterkonstrukten. **A** Ablauf in DGU.US. Das 3'-Ende des SSB kann in die *upstream* liegende Homologie invadieren und wird dort verlängert. Paralleler Abbau des 5'-Endes führt schließlich zur Ausbildung einer Schleife im ungeschnittenen Strang. Wird diese abgebaut, sorgt das für den Verlust des *Spacer* und damit für die Restausrierung der *GUS*-Sequenz. **B** In IU.GUS invadiert das 3'-Ende ebenfalls in den homologen Bereich. Erreicht die Synthese den Abschnitt *downstream* des *Spacer*, so kann der D-loop aufgelöst werden, und es bildet sich ebenfalls eine Schleifenstruktur. **C** In beiden Fällen kann die Schleife auch durch Auffüllen der Lücke aufgelöst werden, was zur Wiederherstellung der Ausgangssituation und damit zu weiterer Induktion von SSBs führt.

4.3.1 Vergleich von HR nach SSBs auf den verschiedenen DNA-Strängen

Die hohe Induktion von HR nach SSB innerhalb des Reporterkonstruktes könnte sich auch durch einen spezialisierten Reparaturmechanismus erklären lassen. Durch Davis & Maizels (2014) wurde die Hypothese aufgestellt, dass es einen Reparaturmechanismus gibt, der mit der Transkription assoziiert ist. Grund für diese Annahme waren Ergebnisse in menschlichen Zellen, nach denen mit einem ähnlichen Reportersystem wesentlich mehr HR zu beobachten war, wenn ein SSB auf dem transkribierten DNA-Strang vorlag.

Bei dem in Abschnitt 3.3 beschriebenen Experiment lag der SSB tatsächlich auf dem transkribierten Strang, jedoch brachte die Induktion eines SSB auf dem anderen Strang nahezu die selben Ergebnisse, es konnte also keine Präferenz der HR für einen der beiden DNA-Stränge nachweisen. Ein möglicher Grund können zum einen unterschiedliche Aktivitäten der eingesetzten sgRNAs sein, die den Unterschied in der HR Rate kompensieren. Dies ist allerdings wenig wahrscheinlich, da es sich dann um eine zufällig zustande gekommene Übereinstimmung der Messwerte handeln müsste. Wahrscheinlicher ist die Annahme, dass es den Transkriptions-assoziierten Reparaturweg in Pflanzen entweder nicht gibt, oder er im vorliegenden Fall nicht verwendet wird. Auch im menschlichen System konnte ein starker Effekt erst beobachtet werden, wenn die Gene für BRCA2 und RAD51 herunterreguliert wurden. Für eine Bestätigung in Pflanzen wäre es daher denkbar, die homologen Gene ebenfalls transkriptionell zu unterdrücken. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen basiert ebenfalls auf Cas9. In Hefe-, menschlichen und Tabakzellen konnte die Expression von Genen durch die Fusion von Aktivatoren oder Repressoren an kathalytisch inaktives dCas9 reguliert werden (Gilbert *et al.*, 2013; Larson *et al.*, 2013; Piatek *et al.*, 2015).

4.3.2 Analyse der Cas9 Nukleasedomänen

Der Einsatz von Cas9-D10A und H840A mit der selben sgRNA im Reporterhintergrund zeigte eine deutlich höhere Rate an HR für D10A. Dies kann direkt mit der Effizienz assoziiert werden, mit der das jeweilige Enzym SSBs induziert. Zwar handelt es sich bei den vorliegenden Ergebnissen um die ersten und aktuell einzigen Analysen zu Cas9 Nickasen in Pflanzen, doch können die Daten mit Ergebnissen aus anderen Organismen verglichen werden. Bei D10A wird der SSB durch das HNH-Motiv durchgeführt, bei H840A durch die RuvC-Domäne (Abbildung 1.5B), sodass mehr Aktivität

vom HNH-Motiv ausgeht. Als mögliche Erklärung dafür ist eine kooperative Wirkung der beiden Nukleasedomänen vorstellbar. Die Betrachtung der Struktur des Cas9 von *S. pyogenes* gibt Hinweise auf eine starke Konformationsänderung bei der Bildung des Komplexes mit der sgRNA und der Ziel-DNA (Jinek *et al.*, 2014; Nishimasu *et al.*, 2014). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das HNH-Motiv dabei wenig reguliert wird, und zuerst nukleolytisch aktiv wird, wobei die RuvC-Domäne von der Aktivität des HNH-Motivs abhängig ist, und daher die H840A Nickase weniger aktiv ist.

Insgesamt können die hier gemachten Untersuchungen zur Aktivität der Domänen durch die Ergebnisse anderer Experimente unterstützt werden. Bei Verwendung gepaarter Nickasen ergaben sich bei mehreren Studien in menschlichen Zellen höhere Mutageneseraten für D10A als für H840A (Nishimasu *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014). Auch die Anwendung des Cas9 Orthologs aus *Staphylococcus aureus* für gepaarte SSBs zeigte kürzlich ähnliche Ergebnisse (Friedland *et al.*, 2015). Bei Verwendung eines GFP-basierten Reporters in menschlichen Zellen wurden ebenfalls leicht reduzierte HR Raten für die H840A Nickase beobachtet (Vriend *et al.*, 2014).

4.4 Analyse von NHEJ als Folge gepaarter SSBs

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Anwendung gepaarter Cas9 Nickasen zur Induktion von NHEJ in Pflanzen demonstriert. Die kominierte Aktivität der Cas9 Nickase an zwei benachbarten Orten im Genom auf beiden DNA-Strängen sorgt für die Ausbildung eines DSB mit langen, einzelsträngigen Überhängen, dessen Reparatur in der Folge für die Ausbildung von Mutationen sorgt.

Die *Deep sequencing* Analyse zeigt, dass die Effizienz der gepaarten Nickasen für zielgerichtete Mutagenese mit der einer einzelnen Nuklease vergleichbar ist. Diese Beobachtung wurde auch in den passenden Experimenten in menschlichen Zellen gemacht, wo in endogenen Loci ebenfalls Mutationsraten von bis zu 40 % bestimmt wurden (Ran *et al.*, 2013). Die Verteilung von Mutationen über die Sequenz des Locus ergibt ein charakteristisches Bild, bei dem die Mutationsraten im Bereich der sgRNA Zielsequenzen am höchsten sind. Diese Charakteristik lässt sich durch die Tatsache erklären, dass eine Mutation, die keine der beiden Zielsequenzen betrifft, also beispielsweise dazwischen liegt, die Aktivität der Nickasen nicht beeinträchtigt. Erst wenn mindestens eine der Zielsequenzen betroffen ist handelt es sich um einen fixierten Zustand, der keiner weiteren Verän-

derung durch NHEJ unterworfen ist. Dabei ist häufig nur eine der beiden Zielsequenzen betroffen, da ein einzelner SSB, der weiterhin durch die zweite sgRNA erzeugt wird, nicht zu weiteren Mutationen führen kann (siehe Abschnitt 3.2.2).

Die Betrachtung einzelner Ereignisse zeigt, dass entstehende Insertionen häufig eine Duplikation eines Sequenzabschnittes erzeugen. Eine detaillierte Beschreibung zugrunde liegender Mechanismen folgt in Abschnitt 4.5.1. Die Ausbildung von Tandemwiederholungen sorgt allerdings nicht notwendigerweise für die Veränderung der sgRNA Zielsequenzen, sodass bei diesen Ereignissen wahrscheinlich wiederum weitere Brüche induziert werden. Dadurch kann es zu der beobachteten größeren Anzahl an Deletionen kommen, da Deletionen im Bereich der Zielsequenzen dazu führen, dass nicht mehr beide SSBs entstehen können, und damit keine weitere Mutagenese erfolgt, bereits vorhandene Insertionen können dabei allerdings verloren gehen.

Allgemein zeigen die beobachteten Mutationen größere Unterschiede als beispielsweise bei Induktion von NHEJ durch die Cas9 Nuklease. Die etwa 50 nt langen, einzelsträngigen Überhänge an den Enden des DSB stellen einen Ausgangspunkt für verschiedene Reparaturmechanismen dar, die zum Teil auch in Konkurrenz zueinander stehen. Es sind verschiedene Prozessierungen zur Reparatur denkbar, wie etwa der nukleolytische Abbau vom freien 5'-Ende aus. Darüber hinaus liegen mit Sicherheit zum Teil auch Mikrohomologien auf den Einzelsträngen vor, durch die bestimmte Strukturen stabilisiert werden können. Ein genauerer Einblick in die möglichen Vorgänge wird in Abschnitt 4.5.1 gegeben.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch gepaarte SSBs erzeugte Mutationen in *A. thaliana* in die nächste Generation weitervererbt werden können. Dabei handelt es sich um den wichtigsten Schritt, wenn die Methode für die Erzeugung neuer Pflanzenlinien eingesetzt werden soll. Gerade in Pflanzen bietet die biotechnologische Anwendung gepaarter SSBs wichtige Vorteile. Viele Pflanzen, insbesondere zahlreiche wichtige Kulturpflanzen, besitzen enorm große Genome, bei denen für zahlreiche Gene, Gencluster und auch gesamte Genome Duplikationen vorliegen, die zum Teil Redundanzen darstellen, zum Teil aber im Laufe der Evolution auch unterschiedliche Funktionen angenommen haben (Übersichten in Fligel & Wendel, 2009; Paterson *et al.*, 2010). Daher ist die Gefahr von *Off-target* Aktivitäten bei der zielgerichteten Mutagenese besonders hoch, was zur Ausbildung unerwünschter Mutationen in paralogen Genen führen würde. Der Ansatz gepaarter SSBs stellt hier also ein einfach anzuwendendes und effizientes Mit-

tel dar, um dieses Risiko zu mindern, da die unabhängige *Off-target* Aktivität der beiden Nickasen nicht zu Mutationen führen kann (siehe Abschnitt 3.2.2).

Die Bedeutung dieses Ansatzes wird auch dadurch unterstrichen, dass er neben den initialen Experimenten in menschlichen Zellen (Mali *et al.*, 2013a; Ran *et al.*, 2013) auch schon auf weitere Organismen wie Mäuse (Shen *et al.*, 2014) oder *Drosophila* (Port *et al.*, 2014) übertragen wurde. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse stellen die erste erfolgreiche Anwendung des Systems auf Pflanzen dar (Schiml *et al.*, 2014).

4.5 Genomveränderungen durch gepaarte SSBs

Für die detaillierte Analyse von Genomveränderungen nach Induktion gepaarter SSBs wurden in drei unterschiedlichen genomischen Regionen (innerhalb eines Gens, im intergenischen Bereich und im Heterochromatin) in verschiedenen Abständen zueinander SSBs auf beiden oder auf dem selben DNA-Strang induziert, und daraus resultierende Mutationen analysiert. Zunächst fällt auf, dass sich mit dem hier gewählten experimentellen System keine Unterschiede zwischen den drei analysierten genomischen Loci zeigen. Das bedeutet, dass es sowohl für die Aktivität Cas9, als auch für die im Folgenden vorgeschlagenen Mechanismen keine Unterschiede gibt, ob es sich um einen Bereich mit verschieden hoher transkriptioneller Aktivität handelt, oder ob ein starker Methylierungsgrad vorliegt.

Auch wenn es bisher noch wenig Studien dazu gibt, scheint die Cas9 Nuklease weder *in vitro* noch *in vivo* reduzierte Aktivität bei methylierter DNA zu zeigen (Hsu *et al.*, 2013). Eine genomweite Untersuchung der Bindungsaffinität von sgRNAs in menschlichen und Mauszellen zeigte hingegen, dass die Bindungsstärke negativ mit dem Methylierungsgrad korreliert (Wu *et al.*, 2014a). Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigen ebenfalls keine detektierbare Beeinträchtigung der Induktion von NHEJ in einem methylierten genomischen Bereich. Eine endgültige Aussage kann jedoch auch hier nicht getroffen werden, da dazu eine ausgiebigere Analyse in weiteren Loci durchgeführt werden müsste und parallel auch die tatsächliche Methylierung der Zielsequenzen bestimmt werden muss.

Unikal für den hier verwendeten Ansatz ist die Tatsache, dass bei einem Abstand von 20 bp zwischen SSBs auf verschiedenen DNA-Strängen nur sehr wenig NHEJ beobachtet werden konnte.

Das stellt einen Unterschied zu den Daten in mammalischen Zellen dar, bei denen auch sehr kurze 5'-Überhänge zu hohen Anzahlen an Insertionen und Deletionen führten (Ran *et al.*, 2013), somit handelt es sich offensichtlich um eine für Pflanzen spezifische Eigenschaft dieses experimentellen Ansatzes.

4.5.1 Betrachtung einzelner Ereignisse nach Induktion gepaarter SSBs

In Abbildung 3.18 liegen einige Größen von Deletionen überrepräsentiert vor. An diesen lässt sich beispielhaft analysieren, nach welchem Mechanismus die Reparatur gepaarter SSBs zur Ausbildung von Deletionen führen könnte. In einem Fall, bei gepaarten SSBs in *ADH1* im Abstand von 100 bp, wurde eine Deletion festgestellt, die mit 17,6 % aller *Reads* den größten Teil aller Mutationen dieses Datensatzes ausmacht. Die Betrachtung des Ereignisses auf Sequenzebene zeigt, dass die Position der SSBs exakt zur Freilegung einer 5 bp langen Mikrohomologie an den 3'-Enden führt (Abbildung 4.3). Diese können in der Folge hybridisieren, und die überstehenden 5'-Enden können entfernt werden. Dadurch kommt es schließlich zur exakten Ausprägung der beobachteten Deletion. Der Vorgang scheint in diesem Fall sehr effizient abzulaufen, da die Mutation deutlich häufiger als jede andere zu finden ist.

Darüber hinaus treten Deletionen auch ohne erkennbare Präsenz einer Mikrohomologie auf. In diesem Fall muss die Prozessierung der freien 5'-Enden des DSB so weit ablaufen, dass kein komplementärer Bereich mehr vorliegt. Letztlich kommt es dann zur Neusynthese der Doppelstränge von den 3'-Enden aus, und schließlich zu einer Ligation der doppelsträngigen Enden über NHEJ, ähnlich dem in Abbildung 4.4B dargestellten Modell.

Insertionen treten nach Induktion gepaarter SSBs fast immer als Duplikation des unmittelbar benachbarten Sequenzabschnittes auf. Ein Größerer Abstand der SSBs sorgt dabei zwar nicht unmittelbar für eine größere Insertion, allerdings bestehen die größten Insertionen bei einem Abstand von 50 bp häufiger aus dreimal der selben inserierten Sequenz, was die Vermutung nahelegt, dass es sich um wiederholte Induktion der SSBs mit anschließender Duplikation des gleichen Abschnittes handelte, da eine Duplikation die Zielsequenzen der sgRNAs meist nicht verändert.

Modelle, nach denen die Ausbildung von Insertionen ablaufen kann, sind in Abbildung 4.4 anhand von Beispielen aus Abbildung 3.19 dargestellt. So kann es nach Dissoziation der einzelsträngigen

Diskussion

ADH1-Referenz C TTCAGCCAGGAGATCATGTGTGCCGATCTTTACCGG...TCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATGATTCAC
 JN35DQI01AL2HF C TTCAGCCAGGAG-----...-----GGATGATTCAC



Abbildung 4.3: Ablauf für die Ausprägung einer Deletion durch Mikrohomologien. Die Induktion der SSBs hinterlässt eine exakte Mikrohomologie an den 3'-Enden der Brüche (blau). Hybridisieren diese, kann der DSB unter Ausbildung der beobachteten Deletion aufgelöst werden.

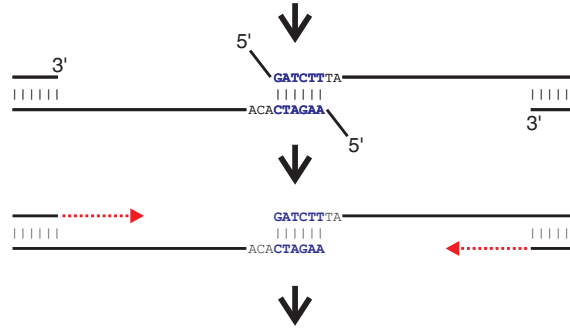
DNA zur Hybridisierung im Bereich von Mikrohomologien kommen. Nach Prozessierung der freien 5'-Enden und Neusynthese von den 3'-Enden aus kann das DNA-Rückgrat wieder geschlossen werden, wobei der Bereich zwischen den Mikrohomologien sowie die Mikrohomologie selbst im Resultat dupliziert vorliegen. Ein Modell für die Entstehung der Duplikation ohne Mikrohomologie wurde bereits nach bioinformatischer Analyse von Genomen verschiedener Reis Ökotypen durch Vaughn & Bennetzen (2014) vorgeschlagen: Demnach kommt es nach Dissoziation der Überhänge zur Prozessierung der 5'-Enden während gleichzeitig auf beiden Seiten von den 3'-Enden aus die Neusynthese beginnt. Am Ende des Vorganges liegen beide Enden des Bruch als stumpfe Enden ohne Überhang vor und können schließlich durch NHEJ verknüpft werden. Auch dieser Fall sorgt für die Bildung der Duplikation, allerdings lassen sich dann keine Mikrohomologien an den Enden des duplizierten Bereichs erkennen.

Liegen SSBs auf dem selben DNA-Strang vor, so sind Mutationen als Folge der Reparatur deutlich seltener. Dennoch lassen sich in geringem Maße auch hier größere Deletionen und in sehr seltenen Fällen auch größere Insertionen beobachten. Zwar haben diese Mutationen keine biotechnologische Bedeutung, allerdings können sie bei der Veränderung von Genomen im Lauf der Evolution eine

A

ADH-o100, Read-ID
 JN35DQI01E1UPD CAGGAGATCATGTGTGGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
 TACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTT

GATCATGTGTGGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
 CAGGA CAGGA
 ||||| |||||
 ||||| CCTCCCTAC
 GTCCTCTAGTACACAACGGCTAGAAATGGCCTGTTACACCCCTCACAGCAGTAACGGTGAGCCTCCTTAGTTTGTACACACTAGAAAGAGTCTAGTTGTGGCTCGCT



CAGGAGATCATGTGTGGCCGATCTTTACCGGAGAATG...CAAACATGTGTGATCTTTACCGGAGAATG...CAAACATGTGTGATCTTCTCAGGATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
 GTCCTCTAGTACACAACGGCTAGAAATGGCCTCTTAC...GTTTGTACACACTAGAAATGGCCTCTTAC...GTTTGTACACACTAGAAAGAGTCTAGTTGTGGCTCGCTCCTCCCTAC

B

ADH-o100, Read-ID
 JN35DQI01EN0R9 CAGGAGATCATGTGTGGCCGATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGG*ATCAACACCGAGCGAGGAGGGATG
 TATCTTTACCGGAGAATGTGGGGAGTGTGCTCATTGCCACTCGGAGGAATCAAACATGTGTGATCTTCTCAGG

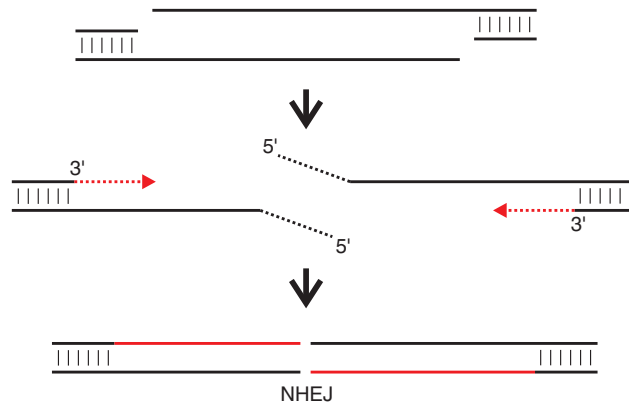


Abbildung 4.4: Modelle für die Ausbildung von Insertionen nach gepaarten SSBs. **A** Modell unter Verwendung von Mikrohomologien. Nach Dissoziation der Enden kann eine Hybridisierung der Mikrohomologien (blau) stattfinden. Neusynthese und Schließen des DNA-Rückgrats führt schließlich zur Ausbildung der Duplikation. **B** Modell nach Vaughn & Bennetzen (2014) ohne Mikrohomologien. Es findet parallel eine Prozessierung der 5'-Enden sowie Neusynthese von den 3'-Enden aus statt. Am Ende werden die Enden des DSB durch NHEJ geschlossen.

Rolle spielen. Während ihres Lebenszyklus ist jede pflanzliche Zelle ständig DNA-schädigenden Faktoren wie UV-Strahlung oder im Stoffwechsel entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt, die unter anderem auch zur Induktion von Brüchen in der DNA führen können. Somit

Diskussion

können über lange Zeiträume hinweg auch diese Ereignisse durchaus eine Rolle bei der evolutionären Veränderung von pflanzlichen Genomen spielen.

Mögliche Abläufe zur Ausbildung von Mutationen werden in Abbildung 4.5 vorgeschlagen. Ausgangspunkt ist die Dissoziation des einzelsträngigen Bereiches, der zwischen den beiden SSBs liegt. Kommt es im dann freiliegenden Bereich zur spontanen Bildung eines weiteren Bruches und zur anschließenden Reparatur über NHEJ, so bildet sich schließlich eine Deletion zwischen den ursprünglichen SSBs. Ohne spontanen Bruch kommt es zur Neusynthese vom 3'-Ende aus, wobei die Möglichkeit von *Template switch* besteht. Dadurch ist die Ausbildung von Duplikationen oder die Kopie von umgebenden Abschnitten möglich.

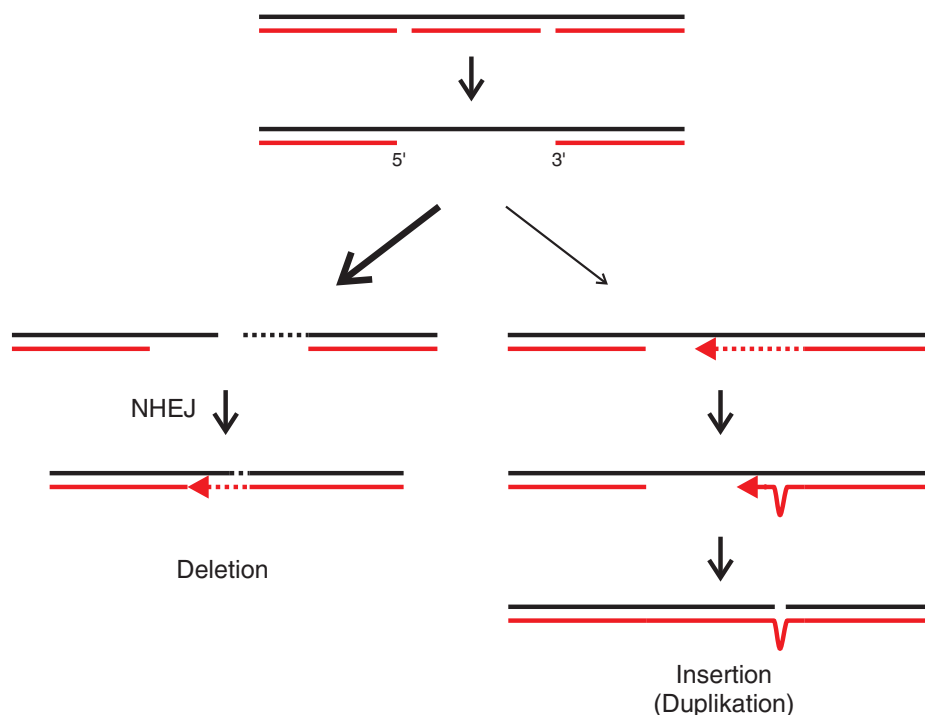


Abbildung 4.5: Veränderungen nach Induktion von SSBs auf einem DNA-Strang. Der einzelsträngige Abschnitt zwischen den SSBs muss zunächst dissoziieren. Für eine Deletion (linke Seite) würde im dann freiliegenden, einzelsträngigen Abschnitt ebenfalls ein Bruch entstehen, der durch Reparatur mittels NHEJ zur Ausprägung von Deletionen führen kann. Für Insertionen (rechts) findet eine Neusynthese entlang des freiliegenden Stranges statt. Im Verlauf dieser Synthese kann es zum *Template switch* kommen, sodass ein Bereich dupliziert wird, oder es dient zeitweise ein weiter entfernt liegender Abschnitt als Matrize. Über die Auflösung des entstehenden Intermediats mit teilweise ungepaarten DNA-Abschnitten kann es zur Bildung der beobachteten Insertionen kommen.

4.5.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zu Genomveränderungen nach benachbarten SSBs stellen nur einen ersten Schritt dar, um die Vorgänge im pflanzlichen Genom zu verstehen. Mit Cas9 steht erstmals ein Werkzeug zur Verfügung, welches einfach anzupassen ist, dabei aber präzise und effizient einsetzbar ist. Als Nickase ist Cas9 anderen Systemen überlegen, bisherige Nickasen basierten entweder auf synthetischen Varianten von Meganukleasen (Niu *et al.*, 2008; McConnell Smith *et al.*, 2009), die eine entsprechende Erkennungssequenz voraussetzen, oder auf Nickase-Varianten von ZFNs oder TALENs (Ramirez *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014b), die ebenfalls weniger Flexibilität bieten als Cas9. Mit der hier charakterisierten Cas9 Nickase besteht die Möglichkeit, mit wenig Aufwand weitere Untersuchungen zu SSB induzierten Genomveränderungen durchzuführen. Denkbar wäre hier etwa die Ausweitung auf weitere Loci, möglicherweise auch mit Überprüfung der tatsächlichen Chromatinstruktur oder des Methylierungsgrades. Außerdem wäre die Untersuchung weiterer Distanzen zwischen den SSBs interessant, etwa um herauszufinden, ab welcher Distanz die Struktur nicht mehr als DSB repariert wird, sondern als zwei unabhängige SSBs. Denkbar könnten auch Unterschiede zum mammalischen System bei der Reparatur von DSBs mit 3'-Überhängen sein. Zwar konnten in mammalischen Zellen in diesem Fall kaum NHEJ Ereignisse beobachtet werden (Ran *et al.*, 2013), doch könnte sich dies in pflanzlichen Zellen unterscheiden. Weiterhin wäre in diesem Zusammenhang die Induktion von mehr als zwei SSBs vorstellbar. Dazu bedarf es allerdings zunächst eines geeigneten Multiplex Systems zu simultanen Expression von mehr als zwei sgRNAs. Zwar bietet das natürliche, bakterielle CRISPR/Cas System grundsätzlich die Möglichkeit, mehrere crRNAs zu exprimieren, eine Übertragung dieses Ansatzes auf Pflanzen wurde jedoch bisher nicht berichtet. Eine elegante Lösung dieses Problems wurde in Reis durch die Kombination mehrerer sgRNAs mit tRNA-Sequenzen erreicht (Xie *et al.*, 2015). Durch Anordnung in einer alternierenden Abfolge aus sgRNAs und tRNAs kommt es dabei zur Prozessierung durch endogene RNasen, die dann die einzelnen sgRNAs freisetzen. Eine Anpassung des Ansatzes für die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte kann die Untersuchung von Genomveränderungen durch mehrere SSBs ermöglichen. Schließlich wird ein wichtiger weiterer Schritt die Analyse in verschiedenen Pflanzenlinien sein, bei denen ein *Knock-out* einzelner Reparaturfaktoren vorliegt, um einen Einblick zu erhalten, welche Proteine an der Prozessierung der verschiedenen Ereignisse beteiligt sind. Für all diese zukünftigen Untersuchungen bietet die hier etablierte Cas9 Nickase das

passende Werkzeug, welches mit wenig Aufwand die einzelnen zu untersuchenden Fälle erzeugen kann.

4.6 Ausblick auf Cas9 als Werkzeug der Grünen Biotechnologie

Cas9 wurde binnen kürzester Zeit nach Entdeckung des molekularen Mechanismus als gentechnologisches Werkzeug etabliert. Durch den simplen Aufbau vor allem im Vergleich zu ZFNs und TALENs wurde das Potential des Systems schnell erkannt und ausgenutzt. Die erfolgreiche Anpassung an eine Vielzahl der verschiedensten Organismen hat dafür gesorgt, dass es bereits heute das am meisten benutzte System sequenzspezifischer Nukleasen ist. Auch bei Pflanzen konnte das System erfolgreich und hoch effizient eingesetzt werden, wobei neben den klassischen Modellorganismen wie *A. thaliana* oder Tabak auch bereits wirtschaftlich wichtige Pflanzenspezies wie Reis, Weizen oder Mais durch Cas9 modifiziert wurden. Eine besondere Bedeutung hat dabei die zielgerichtete Mutagenese für die Grundlagenforschung bei Pflanzen. Über lange Zeit hinweg existierten ausschließlich ungerichtete Methoden zur Mutagenese bei Pflanzen wie der Einsatz von Genotoxinen oder die Generierung von T-DNA Insertionsmutanten. Mit Cas9 steht nun ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem praktisch jedes Labor in kurzer Zeit präzise *Knock-outs* erzeugen kann. Das schlägt sich auch in der Tatsache nieder, dass die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte bereits weltweit in über 160 Arbeitsgruppen verwendet werden.

Die Möglichkeit, schnell und effizient bestimmte Gene zu mutagenisieren eröffnet die Chance, auch solche Gene zu untersuchen, für die bisher keine Insertionsmutanten vorliegen. Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass auch bestehende Charakterisierungen von Genen hinterfragt werden können. In einer überzeugenden Studie konnte durch eine Cas9-vermittelte Mutagenese in *A. thaliana* demonstriert werden, dass der Phänotyp einer ausführlich charakterisierten T-DNA Insertionsmutante des Gens *ABP1* (*Auxin binding protein 1*, AT4G02980) wahrscheinlich gar nicht durch das entsprechende Gen vermittelt wird (Gao *et al.*, 2015). Weitere ähnliche Untersuchungen zur Bestätigung und eventuell auch zur Korrektur von Genfunktionen werden in Zukunft folgen.

Neben der einfachen Anwendung der zielgerichteten Mutagenese wurden auch komplexere Aufgaben durch Cas9 in Pflanzen erfüllt. Mehrere Studien berichteten bereits die Verwendung von Cas9 zum Zweck von GT, eine entsprechende Studie in Soja wurde Mitte 2015 veröffentlicht (Li

et al., 2015). Auch mit der in dieser Arbeit eingesetzten und charakterisierten Cas9 Nuklease wurde erfolgreich ein GT Experiment durchgeführt, bei dem eine heterologe Sequenz mithilfe der *in planta* GT Methode (Fauser *et al.*, 2012) präzise ins Genom von *A. thaliana* integriert werden konnte (Schiml *et al.*, 2014). Cermak *et al.* (2015) kombinierten kürzlich Cas9 mit Virus-basierten Replicons, welche in der Pflanzenzelle sehr häufig repliziert werden, und damit eine große Menge an Donor-Sequenz für das GT Ereignis zur Verfügung stellen. Mit dieser Technik gelangen GT Frequenzen von nahezu 10 %. Für GT kann insbesondere auch die Cas9 Nickase eine wesentliche Rolle spielen. NHEJ ist in somatischem Pflanzengewebe der stark bevorzugte Reparaturweg gegenüber HR. Somit steht das Auftreten eines echten GT Ereignisses nach Induktion eines DSB immer in Konkurrenz zu einer induzierten Mutagenese. Wenn statt eines DSB hingegen ein SSB im Ziel-Locus induziert wird, müsste HR mit höherer Wahrscheinlichkeit auftreten und somit die GT Effizienz erhöhen. Ein vergleichbarer Ansatz wurde bereits erfolgreich in mammalischen Zellen demonstriert und kann durch die Cas9 Nickase nun auch einfach auf Pflanzen übertragen werden (Davis & Mairzels, 2011).

Abseits von der Funktion als Nuklease oder Nickase kann Cas9 weitere Aufgaben erfüllen, etwa als Fusionsprotein aus dCas9 und transkriptionellen Aktivatoren oder Repressoren die Transkription zu beeinflussen (Piatek *et al.*, 2015). Im Kontext der Grünen Biotechnologie kann dies beispielsweise dazu eingesetzt werden, um während eines GT Experiments die Expression von NHEJ-assoziierten Genen herunter zu regulieren, wie es etwa kürzlich in einem entsprechenden Experiment in Reis demonstriert wurde (Endo *et al.*, 2015a). Die nächsten wichtigen Fortschritte in dieser Richtung werden durch die Anpassung weiterer, orthologer CRISPR/Cas Systeme geschaffen. Neben dem Cas9 von *S. pyogenes* wurden im mammalischen System bereits weitere Orthologe erfolgreich getestet (Esvelt *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2015). Die Arbeitsgruppe Puchta konnte vor Kurzem als erste auch die Anwendung der Cas9 Orthologen von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus thermophilus* in Pflanzen zeigen (Steinert *et al.*, 2015), wobei die verschiedenen Cas9 Proteine spezifisch nur mit der passenden sgRNA interagieren. Dadurch wird es in Kürze möglich sein, mehrere unterschiedliche enzymatische Funktionen gezielt an der DNA in der selben Zelle zu steuern, zum Beispiel kombiniert Aktionen von Nukleasen und Nickasen oder die Induktion von DSBs während parallel die Expression bestimmter Reparaturfaktoren manipuliert wird (Übersicht in Puchta, 2015).

4.6.1 Rechtliche Situation für die Pflanzenzüchtung

Mit Pflanzen wie Soja, Tomate, Weizen, Reis und Kartoffel (Jacobs *et al.*, 2015; Brooks *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Endo *et al.*, 2015b; Butler *et al.*, 2015) wurden bereits einige bedeutende Kulturpflanzen erfolgreich durch Cas9 modifiziert. Das zeigt, dass Cas9 in der Zukunft nicht nur in der Grundlagenforschung sondern vor allem auch wirtschaftlich von Bedeutung sein wird. Eine noch zu überwindende Hürde dazu stellt die noch offene Frage des geistigen Eigentums von Cas9, also der Patentrechte, dar (Übersicht in Kupecz, 2014). Derzeit besteht Uneinigkeit zwischen den beiden leitenden Wissenschaftlerinnen hinter der Aufklärung des Mechanismus von Cas9, Emmanuelle Charpentier (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) und Jennifer Doudna (University of California, Berkeley), sowie Feng Zhang (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA), dessen Arbeitsgruppe die erste Anwendung von Cas9 im eukaryotischen System gelang. Erst die Lösung dieser Streitfrage wird dazu führen, dass Cas9 auch für kommerzielle Nutzung im medizinischen Bereich oder in der Pflanzenzüchtung eingesetzt werden wird.

Unabhängig davon stellt sich die Frage nach der rechtlichen Einordnung von Organismen, die mit sequenzspezifischen Nukleasen verändert wurden. Hier existieren aktuell zwei grundsätzliche Ansätze der Bewertung (Übersichten in Hartung & Schiemann, 2014; Voytas & Gao, 2014). Die gegenwärtig beispielsweise in den USA und Kanada gängige Regelung klassifiziert einen Organismus nach dem fertigen Produkt. Es handelt sich also nur dann um einen gentechnisch veränderten Organismus (GVO), wenn sich noch heterologe DNA nachweisen lässt und sich in folgende Generationen verbreiten kann. In der EU wird der Organismus nach seinem Entstehungsprozess bewertet, waren gentechnische Arbeiten in die Herstellung involviert, so ist das Produkt ungeachtet seines tatsächlichen genetischen Zustands ein GMO. Diese Einordnung wird aber zunehmend problematisch, vor allem im Kontext der durch Cas9 enorm vereinfachten zielgerichteten Mutagenese. Da das Konstrukt zur Expression transient transformiert werden, oder nach erfolgter Mutagenese durch Segregation entfernt werden kann, sind die entstandenen Pflanzen von konventionell gezüchteten Pflanzen nicht mehr zu unterscheiden, da die Mutation auch ungerichtet oder sogar spontan entstanden sein kann. Sogar präzise molekularbiologische Methoden oder gar die komplette Genomsequenzierung kann solche Pflanzen nicht von wildtypischen unterscheiden. Koreanischen Forschern gelang es kürzlich sogar, mutagenisierte Pflanzen komplett ohne Transformation

Diskussion

herzustellen, indem sie Cas9 Protein und sgRNA in die Zellen einbrachten, und diese damit zu keinem Zeitpunkt ihrer Entstehung transgen waren (Woo *et al.*, 2015). Diese Pflanzen sind mit der aktuellen Regelung in der EU nicht klassifizierbar und zeigen, dass die Rechtslage in Anbetracht der jüngsten wissenschaftlichen Errungenschaften in diesem Bereich überdacht werden muss.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vektorset kloniert, das die schnelle und effiziente Klonierung von Cas9 Nukleasen und Nickasen zum Einsatz in *A. thaliana* und anderen Pflanzen ermöglicht. Durch *Amplicon deep sequencing* Analyse konnte festgestellt werden, dass die Cas9 Nuklease in etwa der Hälfte aller Fälle eine Mutation im gewünschten endogenen Locus erzeugte. Die erhaltenen Mutationen waren dabei meistens die Insertion eines einzelnen Nukleotids, was zur Verschiebung des Leserasters und damit zum *Knock-out* des entsprechenden Gens führte. Im Gegensatz dazu konnten durch eine Cas9 Nickase keine detektierbaren Mutationen verursacht werden. Allerdings waren sowohl Cas9 Nuklease als auch Nickase in der Lage dazu, in zwei Reporterlinien von *A. thaliana* effizient HR zu induzieren, vergleichbar mit der Induktion durch die Meganuklease *I-SceI*. Überraschenderweise konnte die höchste Rate an HR durch die Cas9 Nickase verursacht werden. Die HR hing dabei nicht vom geschnittenen DNA-Strang ab, ist also nicht mit der Transkription des Reportergens assoziiert. Die D10A Nickase von Cas9 zeigte eine wesentlich höhere Induktion von HR als die H840A Variante, was darauf hindeutet, dass das HNH-Motiv die deutlich aktivere Nukleasedomäne von Cas9 ist.

Des Weiteren wurde die Induktion von NHEJ durch den Einsatz gepaarter Cas9 Nickasen analysiert. Die Effizienz der zielgerichteten Mutagenese war dabei auf einem vergleichbaren Niveau wie bei der Cas9 Nuklease. Entstehende Mutationen waren in *A. thaliana* ebenfalls erblich, der Ansatz kann also als Alternative zur Cas9 Nuklease zu zielgerichteten Mutagenese angewendet werden, wenn beispielsweise eine Duplikation des Zielgens vorliegt.

Die Analyse von Ereignissen nach Induktion gepaarter SSBs wurde auf drei weitere Loci in verschiedenen genetischen Bereichen ausgeweitet, wobei die Abstände der SSBs zueinander variiert wurde. Zusätzlich wurden die SSBs sowohl auf beiden als auch auf dem selben DNA-Strang induziert. Dabei zeigte sich zum einen keine Abhängigkeit vom genomischen Hintergrund des Locus, also keine Unterschiede durch transkriptionelle Aktivität, Chromatinstruktur oder Methylierung. Bei Induktion von SSBs auf beiden DNA-Strängen zeigte sich für den Abstand von 20 bp zwischen den SSBs nur ein geringes Maß an NHEJ, bei 100 bp war die Effizienz ähnlich hoch oder sogar höher als bei 50 bp. Interessanterweise konnten auch bei Induktion von SSBs auf dem selben DNA-Strang in geringem Maß Mutationen beobachtet werden. Für verschiedene erhaltene Ereignisse wurden entsprechende Modelle der abgelaufenen Reparatur vorgeschlagen, bei denen sich zum Teil eine

Zusammenfassung

deutliche Beteiligung von Mikrohomologien für die Reparatur der DNA-Schäden zeigte.

Die charakterisierte Cas9 Nickase und die erhaltenen Ergebnisse zu Genomveränderungen nach gepaarten SSBs stellen die Basis für folgende Untersuchungen zu Veränderungen pflanzlicher Genome im Verlauf der Evolution und den zugrunde liegenden Mechanismen dar.

6 Summary

In this work, a vectorset was cloned which allows for the fast and efficient cloning of Cas9 nucleases and nickases for the application to *A. thaliana* and other plants. Amplicon deep sequencing analysis revealed the induction of a mutation in the desired endogenous locus by the Cas9 nuclease in about half of all cases. Resulting mutations were mostly insertions of a single nucleotide, thus leading to frameshifts and therefore the knock-out of the gene. The Cas9 nickase, however, was not able to induce any detectable mutations. Both the Cas9 nuclease as well as the nickase were able to efficiently induce HR to a similar extent as the meganuclease *I-SceI* in two reporter lines of *A. thaliana*. Surprisingly, the highest rate of HR was caused by the Cas9 nickase. There was no dependency on the cut strand observable, therefore, HR was not associated with transcription of the reporter gene. The D10A variant of Cas9 showed much higher induction of HR than the H840A variant, indicating that of the two nuclease domains the HNH-motif is by far more active.

Furthermore, the induction of NHEJ by the application of paired Cas9 nickases was analysed. The efficiency of targeted mutagenesis was determined to be at a comparable level to that of the Cas9 nuclease. Resulting mutations were heritable in *A. thaliana*, thus, the approach can be used as an alternative for the Cas9 nuclease if, for example, the target gene is duplicated.

The analysis of resulting events after induction of paired SSBs was extended to three additional loci in different genomic regions. The distances between the SSBs was varied and SSBs were induced either on both or on the same DNA strand. In this approach, no dependency on the genomic background of the target site was observed, indicating that transcriptional activity, chromatin structure or methylation did not cause any differences. Upon induction of SSBs on both DNA strands, there was only a small level of NHEJ for the distance of 20-nts between the two SSBs. For 100-bps distance, the efficiency was similar or even higher than the efficiency for 50-bps. Interestingly, also for induction of SSBs on the same strand, small amounts of mutations could be observed. For different mutagenesis results, respective models for the repair mechanisms were proposed, partly exhibiting clear involvement of microhomologies.

The characterized Cas9 nickase and the results for genomic changes due to paired SSBs mark the basis for future investigations on the evolution of plant genomes and the underlying mechanisms.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmad, A., Robinson, A. R., Duensing, A., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Weisberg, D. B., Hasty, P., Hoeijmakers, J. H. J. & Niedernhofer, L. J. 2008. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 28(16): 5082–5092.
- Ali, Z., Abul-Faraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, M., Mahjoub, A., Aouida, M., Piatek, A., Baltes, N. J., Voytas, D. F., Dinesh-Kumar, S. & Mahfouz, M. M. 2015. Efficient Virus-Mediated Genome Editing in Plants Using the CRISPR/Cas9 System. *Mol Plant* 8(8): 1288–1291.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. & Ecker, J. R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301(5633): 653–657.
- Amiard, S., Charbonnel, C., Allain, E., Depeiges, A., White, C. I. & Gallego, M. E. 2010. Distinct roles of the ATR kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the maintenance of chromosomal stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22(9): 3020–3033.
- Antunes, M. S., Smith, J. J., Jantz, D. & Medford, J. I. 2012. Targeted DNA excision in *Arabidopsis* by a re-engineered homing endonuclease. *BMC Biotechnol* 12: 86.
- Arabidopsis Genome Initiative, . 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): 796–815.
- Arnould, S., Chames, P., Perez, C., Lacroix, E., Duclert, A., Epinat, J.-C., Stricher, F., Petit, A.-S., Patin, A., Guillier, S., Rolland, S., Prieto, J., Blanco, F. J., Bravo, J., Montoya, G., Serrano, L., Duchateau, P. & Pâques, F. 2006. Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *J Mol Biol* 355(3): 443–458.
- Arnould, S., Perez, C., Cabaniols, J.-P., Smith, J., Gouble, A., Grizot, S., Epinat, J.-C., Duclert, A., Duchateau, P. & 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(1): 49–65.
- Assaad, F. F. & Signer, E. R. 1990. Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 223(3): 517–520.
- Athma, P. & Peterson, T. 1991. Ac induces homologous recombination at the maize P locus. *Genetics* 128(1): 163–173.
- Audebert, M., Salles, B. & 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(53): 55117–55126.
- Bae, S., Park, J. & Kim, J.-S. 2014. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30(10): 1473–1475.
- Baltes, N. J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P. A. & Voytas, D. F. 2014. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell* 26(1): 151–163.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. & Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819): 1709–1712.
- Bernard, P. & Couturier, M. 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226(3): 735–745.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G. & Carroll, D. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161(3): 1169–1175.
- Bitinaite, J., Wah, D. A., Aggarwal, A. K. & Schildkraut, I. 1998. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10570–10575.

- Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A. & Taylor, J.** 2010. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 19: Unit 19.10.1–Unit 19.10.21.
- Blitz, I. L., Biesinger, J., Xie, X. & Cho, K. W. Y.** 2013. Biallelic genome modification in F(0) *Xenopus tropicalis* embryos using the CRISPR/Cas system. *Genesis* 51(12): 827–834.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. & Bonas, U.** 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326(5959): 1509–1512.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S. D.** 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151(Pt 8): 2551–2561.
- Bonas, U., Stall, R. E. & Staskawicz, B.** 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet* 218(1): 127–136.
- Boulton, S. J. & Jackson, S. P.** 1996. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J* 15(18): 5093–5103.
- Braun, A. C.** 1947. Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. *Am J Bot* 34(4): 234–240.
- Bray, C. M. & West, C. E.** 2005. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol* 168(3): 511–528.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B. & Van Eck, J.** 2014. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol* 166(3): 1292–1297.
- Burma, S., Chen, B. P. C. & Chen, D. J.** 2006. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10): 1042–1048.
- Butler, N. M., Atkins, P. A., Voytas, D. F. & Douches, D. S.** 2015. Generation and Inheritance of Targeted Mutations in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using the CRISPR/Cas System. *PLoS One* 10(12): e0144591.
- Carbery, I. D., Ji, D., Harrington, A., Brown, V., Weinstein, E. J., Liaw, L. & Cui, X.** 2010. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* 186(2): 451–459.
- Cermak, T., Baltés, N. J., Cegan, R., Zhang, Y. & Voytas, D. F.** 2015. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* 16: 232.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J. & Voytas, D. F.** 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 39(12): e82.
- Certo, M. T., Ryu, B. Y., Annis, J. E., Garibov, M., Jarjour, J., Rawlings, D. J. & Scharenberg, A. M.** 2011. Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. *Nat Methods* 8(8): 671–676.
- Charbonnel, C., Allain, E., Gallego, M. E. & White, C. I.** 2011. Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in *Arabidopsis*. *DNA Repair (Amst)* 10(6): 611–619.
- Charbonnel, C., Gallego, M. E. & White, C. I.** 2010. Xrcc1-dependent and Ku-dependent DNA double-strand break repair kinetics in *Arabidopsis* plants. *Plant J* 64(2): 280–290.
- Chen, Y., Zheng, Y., Kang, Y., Yang, W., Niu, Y., Guo, X., Tu, Z., Si, C., Wang, H., Xing, R., Pu, X., Yang, S.-H., Li, S., Ji, W. & Li, X.-J.** 2015. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet* 24(13): 3764–3774.
- Chevalier, B. S., Kortemme, T., Chadsey, M. S., Baker, D., Monnat, R. J. & Stoddard, B. L.** 2002. Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease. *Mol Cell* 10(4): 895–905.
- Chilton, M.-D. M. & Que, Q.** 2003. Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiol* 133(3): 956–965.
- Chiurazzi, M., Ray, A., Viret, J. F., Perera, R., Wang, X. H., Lloyd, A. M. & Signer, E. R.** 1996. Enhancement of

- somatic intrachromosomal homologous recombination in Arabidopsis by the HO endonuclease. *Plant Cell* 8(11): 2057–2066.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S. & Kim, J.-S.** 2014. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 24(1): 132–141.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J. & Voytas, D. F.** 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186(2): 757–761.
- Clough, S. J. & Bent, A. F.** 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16(6): 735–743.
- Colleaux, L., d’Auriol, L., Betermier, M., Cottarel, G., Jacquier, A., Galibert, F. & 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(4): 521–533.
- Colleaux, L., D’Auriol, L., Galibert, F. & Dujon, B.** 1988. Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(16): 6022–6026.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. & Zhang, F.** 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121): 819–823.
- Cornu, T. I. & Cathomen, T.** 2010. Quantification of zinc finger nuclease-associated toxicity. *Methods Mol Biol* 649: 237–245.
- Cornu, T. I., Thibodeau-Beganny, S., Guhl, E., Alwin, S., Eichinger, M., Joung, J. K., Joung, J. K. & Cathomen, T.** 2008. DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol Ther* 16(2): 352–358.
- Cove, D.** 2005. The moss Physcomitrella patens. *Annu Rev Genet* 39: 339–358.
- Cox, D. B. T., Platt, R. J. & Zhang, F.** 2015. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med* 21(2): 121–131.
- Crosetto, N., Mitra, A., Silva, M. J., Bienko, M., Dojer, N., Wang, Q., Karaca, E., Chiarle, R., Skrzypczak, M., Ginalski, K., Pasero, P., Rowicka, M. & Dikic, I.** 2013. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods* 10(4): 361–365.
- Curtin, S. J., Zhang, F., Sander, J. D., Haun, W. J., Starker, C., Baltes, N. J., Reyon, D., Dahlborg, E. J., Goodwin, M. J., Coffman, A. P., Dobbs, D., Joung, J. K., Voytas, D. F. & Stupar, R. M.** 2011. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol* 156(2): 466–473.
- Davis, L. & Maizels, N.** 2011. DNA nicks promote efficient and safe targeted gene correction. *PLoS One* 6(9): e23981.
- Davis, L. & Maizels, N.** 2014. Homology-directed repair of DNA nicks via pathways distinct from canonical double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(10): E924–E932.
- de Pater, S., Neuteboom, L. W., Pinas, J. E., Hooykaas, P. J. J. & van der Zaal, B. J.** 2009. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in Arabidopsis through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol J* 7(8): 821–835.
- Decottignies, A.** 2007. Microhomology-mediated end joining in fission yeast is repressed by pku70 and relies on genes involved in homologous recombination. *Genetics* 176(3): 1403–1415.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. & Charpentier, E.** 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471(7340): 602–607.
- Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J.-K., Shi, Y. & Yan, N.** 2012. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* 335(6069): 720–723.
- D’Halluin, K., Vanderstraeten, C., Van Hulle, J., Rosolowska, J., Van Den Brande, I., Pennewaert, A., D’Hont, K., Bossut, M., Jantz, D., Ruiters, R. & Broadhvest, J.** 2013. Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant Biotechnol J* 11(8): 933–941.

- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J. & Church, G. M. 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 41(7): 4336–4343.
- Dickinson, D. J., Ward, J. D., Reiner, D. J. & Goldstein, B. 2013. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods* 10(10): 1028–1034.
- Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B. L., Xavier, R. J. & Root, D. E. 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol* 32(12): 1262–1267.
- Doyle, E. L., Booher, N. J., Standage, D. S., Voytas, D. F., Brendel, V. P., Vandyk, J. K. & Bogdanove, A. J. 2012. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res* 40(Web Server issue): W117–W122.
- Dürrenberger, F. & Rochaix, J. D. 1991. Chloroplast ribosomal intron of *Chlamydomonas reinhardtii*: in vitro self-splicing, DNA endonuclease activity and in vivo mobility. *EMBO J* 10(11): 3495–3501.
- Dubest, S., Gallego, M. E. & White, C. I. 2002. Role of the AtRad1p endonuclease in homologous recombination in plants. *EMBO Rep* 3(11): 1049–1054.
- Duda, K., Lonowski, L. A., Kofoed-Nielsen, M., Ibarra, A., Delay, C. M., Kang, Q., Yang, Z., Pruett-Miller, S. M., Bennett, E. P., Wandall, H. H., Davis, G. D., Hansen, S. H. & Frödin, M. 2014. High-efficiency genome editing via 2A-coupled co-expression of fluorescent proteins and zinc finger nucleases or CRISPR/Cas9 nickase pairs. *Nucleic Acids Res* 42(10): e84.
- Dujon, B. 1980. Sequence of the intron and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNA gene of yeast strains having different alleles at the omega and rib-1 loci. *Cell* 20(1): 185–197.
- Dujon, B. 1989. Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations—a review. *Gene* 82(1): 91–114.
- Durai, S., Mani, M., Kandavelou, K., Wu, J., Porteus, M. H. & Chandrasegaran, S. 2005. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 33(18): 5978–5990.
- Endo, M., Mikami, M. & Toki, S. 2015a. Bi-allelic gene targeting in rice. *Plant Physiol* pp.15.01663.
- Endo, M., Mikami, M. & Toki, S. 2015b. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Physiol* 56(1): 41–47.
- Epinat, J.-C., Arnould, S., Chames, P., Rochaix, P., Desfontaines, D., Puzin, C., Patin, A., Zanghellini, A., Pâques, F. & Lacroix, E. 2003. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31(11): 2952–2962.
- Esvelt, K. M., Mali, P., Braff, J. L., Moosburner, M., Yang, S. J. & Church, G. M. 2013. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods* 10(11): 1116–1121.
- Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y. & Luo, K. 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in *Populus* in the First Generation. *Sci Rep* 5: 12217.
- Fausser, F., Roth, N., Pacher, M., Ilg, G., Sánchez-Fernández, R., Biesgen, C. & Puchta, H. 2012. In planta gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(19): 7535–7540.
- Fausser, F., Schiml, S. & Puchta, H. 2014. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 79(2): 348–359.
- Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S. & 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(13): 2585–2596.
- Feng, Z., Mao, Y., Xu, N., Zhang, B., Wei, P., Yang, D.-L., Wang, Z., Zhang, Z., Zheng, R., Yang, L., Zeng, L., Liu, X. & Zhu, J.-K. 2014. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(12): 4632–4637.
- Flagel, L. E. & Wendel, J. F. 2009. Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytol* 183(3):

- 557–564.
- Frey, K. G., Herrera-Galeano, J. E., Redden, C. L., Luu, T. V., Servetas, S. L., Mateczun, A. J., Mokashi, V. P. & Bishop-Lilly, K. A. 2014. Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. *BMC Genomics* 15: 96.
- Friedland, A. E., Baral, R., Singhal, P., Loveluck, K., Shen, S., Sanchez, M., Marco, E., Gotta, G. M., Maeder, M. L., Kennedy, E. M., Kornepati, A. V. R., Sousa, A., Collins, M. A., Jayaram, H., Cullen, B. R. & Bumcrot, D. 2015. Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol* 16(1): 257.
- Friedland, A. E., Tzur, Y. B., Esvelt, K. M., Colaiácovo, M. P., Church, G. M. & Calarco, J. A. 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods* 10(8): 741–743.
- Friesner, J. & Britt, A. B. 2003. Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J* 34(4): 427–440.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M. & Joung, J. K. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 32(3): 279–284.
- Gao, H., Smith, J., Yang, M., Jones, S., Djukanovic, V., Nicholson, M. G., West, A., Bidney, D., Falco, S. C., Jantz, D. & Lyznik, L. A. 2010. Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant J* 61(1): 176–187.
- Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, D., Dai, X., Estelle, M. & Zhao, Y. 2015. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(7): 2275–2280.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39): E2579–E2586.
- Gelvin, S. B. 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(1): 16–37, table of contents.
- Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R. C., Burhans, R., Elnitski, L., Shah, P., Zhang, Y., Blankenberg, D., Albert, I., Taylor, J., Miller, W., Kent, W. J. & Nekrutenko, A. 2005. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res* 15(10): 1451–1455.
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S. & Qi, L. S. 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154(2): 442–451.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Jha, M. & Tuteja, N. 2015. DNA damage and repair in plants under ultraviolet and ionizing radiations. *ScientificWorldJournal* 2015: 250158.
- Gimble, F. S., Moure, C. M. & Posey, K. L. 2003. Assessing the plasticity of DNA target site recognition of the *PI-SceI* homing endonuclease using a bacterial two-hybrid selection system. *J Mol Biol* 334(5): 993–1008.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J. & G. T. 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol* 11(8): R86.
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., Wildonger, J. & O'Connor-Giles, K. M. 2013. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* 194(4): 1029–1035.
- Grizot, S., Duclert, A., Thomas, S., Duchateau, P. & Pâques, F. 2011. Context dependence between subdomains in the DNA binding interface of the *I-CreI* homing endonuclease. *Nucleic Acids Res* 39(14): 6124–6136.
- Guilinger, J. P., Thompson, D. B. & Liu, D. R. 2014. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol* 32(6): 577–582.
- Haber, J. E., Ira, G., Malkova, A. & Sugawara, N. 2004. Repairing a double-strand chromosome break by homologous recombination: revisiting Robin Holliday's model. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1441): 79–86.
- Haber, J. E. & Leung, W. Y. 1996. Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken

7 Literaturverzeichnis

- chromosome ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13949–13954.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. & Maliga, P.** 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25(6): 989–994.
- Hartung, F. & Schiemann, J.** 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J* 78(5): 742–752.
- Haun, W., Coffman, A., Clasen, B. M., Demorest, Z. L., Lowy, A., Ray, E., Retterath, A., Stoddard, T., Juillerat, A., Cedrone, F., Mathis, L., Voytas, D. F. & Zhang, F.** 2014. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J* 12(7): 934–940.
- Hefferin, M. L. & Tomkinson, A. E.** 2005. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* 4(6): 639–648.
- Herbers, K., Conrads-Strauch, J. & Bonas, U.** 1992. Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature* 356(6365): 172–174.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. & Schell, J.** 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303: 209–213.
- Hill, J. T., Demarest, B. L., Bisgrove, B. W., Su, Y.-C., Smith, M. & Yost, H. J.** 2014. Poly peak parser: Method and software for identification of unknown indels using sanger sequencing of polymerase chain reaction products. *Dev Dyn* 243(12): 1632–1636.
- Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inzé, D., Engler, G. & Villarroel, R.** 1980. The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTiC58. *Plasmid* 3(2): 212–230.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G. & Zhang, F.** 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31(9): 827–832.
- Hurt, J. A., Thibodeau, S. A., Hirsh, A. S., Pabo, C. O. & Joung, J. K.** 2003. Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell-based selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12271–12276.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J.-R. J. & Joung, J. K.** 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31(3): 227–229.
- Hyun, Y., Kim, J., Cho, S. W., Choi, Y., Kim, J.-S. & Coupland, G.** 2015. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta* 241(1): 271–284.
- Isalan, M., Choo, Y. & Klug, A.** 1997. Synergy between adjacent zinc fingers in sequence-specific DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11): 5617–5621.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A.** 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169(12): 5429–5433.
- Jackson, S. P.** 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23(5): 687–696.
- Jacobs, J. Z., Ciccaglione, K. M., Tournier, V. & Zaratiegui, M.** 2014. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. *Nat Commun* 5: 5344.
- Jacobs, T. B., LaFayette, P. R., Schmitz, R. J. & Parrott, W. A.** 2015. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol* 15: 16.
- Jacquier, A. & Dujon, B.** 1985. An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* 41(2): 383–394.
- Jia, H. & Wang, N.** 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One* 9(4): e93806.
- Jia, Q., den Dulk-Ras, A., Shen, H., Hooykaas, P. J. J. & de Pater, S.** 2013. Poly(ADP-ribose)polymerases are

7 Literaturverzeichnis

- involved in microhomology mediated back-up non-homologous end joining in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 82(4-5): 339–351.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A.** 2013a. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31(3): 233–239.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B. & Weeks, D. P.** 2013b. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* 41(20): e188.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E.** 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096): 816–821.
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A. T., Charpentier, E., Nogales, E. & Doudna, J. A.** 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 343(6176): 1247997.
- Kadyk, L. C. & Hartwell, L. H.** 1992. Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 132(2): 387–402.
- Kawalleck, P., Somssich, I. E., Feldbrügge, M., Hahlbrock, K. & Weisshaar, B.** 1993. Polyubiquitin gene expression and structural properties of the ubi4-2 gene in *Petroselinum crispum*. *Plant Mol Biol* 21(4): 673–684.
- Kawara, K.** 1963. Introduction of a gamma field in Japan. *Radiation Botany* 3(2): 175 – 177.
- Kay, S., Boch, J. & Bonas, U.** 2005. Characterization of AvrBs3-like effectors from a Brassicaceae pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol Plant Microbe Interact* 18(8): 838–848.
- Kay, S. & Bonas, U.** 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 12(1): 37–43.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. & Bonas, U.** 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 318(5850): 648–651.
- Kim, H. & Kim, J.-S.** 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 15(5): 321–334.
- Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S.** 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3): 1156–1160.
- Kirik, A., Salomon, S. & Puchta, H.** 2000. Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants. *EMBO J* 19(20): 5562–5566.
- Klein, T. M., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. & Sanford, J. C.** 1988a. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12): 4305–4309.
- Klein, T. M., Harper, E. C., Svab, Z., Sanford, J. C., Fromm, M. E. & Maliga, P.** 1988b. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22): 8502–8505.
- Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., Gonzales, A. P. W., Li, Z., Peterson, R. T., Yeh, J.-R. J., Aryee, M. J. & Joung, J. K.** 2015. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 523(7561): 481–485.
- Knoll, A., Fauser, F. & Puchta, H.** 2014. DNA recombination in somatic plant cells: mechanisms and evolutionary consequences. *Chromosome Res* 22(2): 191–201.
- Koncz, C., Kreuzaler, F., Kalman, Z. & 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(5): 1029–1037.
- Kondo, S. & Ueda, R.** 2013. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*

7 Literaturverzeichnis

- phila. *Genetics* 195(3): 715–721.
- Koo, T., Lee, J. & Kim, J.-S.** 2015. Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *Mol Cells* 38(6): 475–481.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. & Zhao, X.** 2012. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res* 40(13): 5795–5818.
- Kupecz, A.** 2014. Who owns CRISPR-Cas9 in Europe? *Nat Biotechnol* 32(12): 1194–1196.
- Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J. & Adli, M.** 2014. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol* 32(7): 677–683.
- Larson, M. H., Gilbert, L. A., Wang, X., Lim, W. A., Weissman, J. S. & Qi, L. S.** 2013. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc* 8(11): 2180–2196.
- Lei, Y., Lu, L., Liu, H.-Y., Li, S., Xing, F. & Chen, L.-L.** 2014. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant* 7(9): 1494–1496.
- Li, J.-F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G. M. & Sheen, J.** 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* 31(8): 688–691.
- Li, K., Wang, G., Andersen, T., Zhou, P. & Pu, W. T.** 2014. Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. *PLoS One* 9(8): e105779.
- Li, T., Huang, S., Zhao, X., Wright, D. A., Carpenter, S., Spalding, M. H., Weeks, D. P. & Yang, B.** 2011. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 39(14): 6315–6325.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P. & Yang, B.** 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 30(5): 390–392.
- Li, X., Jiang, D.-H., Yong, K. & Zhang, D.-B.** 2007. Varied Transcriptional Efficiencies of Multiple Arabidopsis U6 Small Nuclear RNA Genes. *J Integr Plant Biol* 49(2): 222–229.
- Li, Z., Liu, Z.-B., Xing, A., Moon, B. P., Koellhoffer, J. P., Huang, L., Ward, R. T., Clifton, E., Falco, S. C. & Cigan, A. M.** 2015. Cas9-guide RNA Directed Genome Editing in Soybean. *Plant Physiol* .
- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K. & Gao, C.** 2014. Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics* 41(2): 63–68.
- Liao, H.-K., Gu, Y., Diaz, A., Marlett, J., Takahashi, Y., Li, M., Suzuki, K., Xu, R., Hishida, T., Chang, C.-J., Esteban, C. R., Young, J. & Izpissua Belmonte, J. C.** 2015. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun* 6: 6413.
- Lin, F. L., Sperle, K. & 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(6): 1020–1034.
- Liu, Y., Kao, H.-I. & Bambara, R. A.** 2004. Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 73: 589–615.
- Lloyd, A., Plaisier, C. L., Carroll, D. & Drews, G. N.** 2005. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(6): 2232–2237.
- Lloyd, A. H., Wang, D. & Timmis, J. N.** 2012. Single molecule PCR reveals similar patterns of non-homologous DSB repair in tobacco and Arabidopsis. *PLoS One* 7(2): e32255.
- Lyndaker, A. M. & Alani, E.** 2009. A tale of tails: insights into the coordination of 3' end processing during homologous recombination. *Bioessays* 31(3): 315–321.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Y., Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z. & Liu, Y.-G.** 2015. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Mol Plant* 8(8): 1274–1284.

- Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Osiak, A., Wright, D. A., Anthony, R. M., Eichinger, M., Jiang, T., Foley, J. E., Winfrey, R. J., Townsend, J. A., Unger-Wallace, E., Sander, J. D., Müller-Lerch, F., Fu, F., Pearlberg, J., Göbel, C., Dassie, J. P., Pruett-Miller, S. M., Porteus, M. H., Sgroi, D. C., Iafrate, A. J., Dobbs, D., McCray, P. B., Jr, Cathomen, T., Voytas, D. F. & Joung, J. K. 2008. Rapid open-source engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell* 31(2): 294–301.
- Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Sander, J. D., Voytas, D. F. & Joung, J. K. 2009. Oligomerized pool engineering (OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nat Protoc* 4(10): 1471–1501.
- Mahfouz, M. M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X. & Zhu, J.-K. 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2623–2628.
- Mak, A. N.-S., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J. & Stoddard, B. L. 2012. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* 335(6069): 716–719.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 1: 7.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J. & Koonin, E. V. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9(6): 467–477.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L. & Church, G. M. 2013a. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol* 31(9): 833–838.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. & Church, G. M. 2013b. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121): 823–826.
- Mannuss, A., Dukowic-Schulze, S., Suer, S., Hartung, F., Pacher, M. & Puchta, H. 2010. RAD5A, RECQ4A, and MUS81 have specific functions in homologous recombination and define different pathways of DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22(10): 3318–3330.
- Martin, I. V. & MacNeill, S. A. 2002. ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol* 3(4): REVIEWS3005.
- Marton, I., Zuker, A., Shklarman, E., Zeevi, V., Tovkach, A., Roffe, S., Ovadis, M., Tzfira, T. & Vainstein, A. 2010. Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol* 154(3): 1079–1087.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J. & de Murcia, G. 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 18(6): 3563–3571.
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A. & Henikoff, S. 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol* 18(4): 455–457.
- McConnell Smith, A., Takeuchi, R., Pellenz, S., Davis, L., Maizels, N., Monnat, R. J., Jr & Stoddard, B. L. 2009. Generation of a nicking enzyme that stimulates site-specific gene conversion from the I-Anil LAGLI-DADG homing endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(13): 5099–5104.
- Meyer, M., de Angelis, M. H., Wurst, W. & Kühn, R. 2010. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(34): 15022–15026.
- Mladenov, E. & Iliakis, G. 2011. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res* 711(1-2): 61–72.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155(Pt 3): 733–740.
- Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffer, S. & Hohn, B. 2004. Interchromatid and interhomolog recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16(2): 342–352.

- Morton, J., Davis, M. W., Jorgensen, E. M. & Carroll, D. 2006. Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44): 16370–16375.
- Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326(5959): 1501.
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J. D. G. & Kamoun, S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31(8): 691–693.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F. & Nureki, O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156(5): 935–949.
- Nishizawa-Yokoi, A., Nonaka, S., Saika, H., Kwon, Y.-I., Osakabe, K. & Toki, S. 2012. Suppression of Ku70/80 or Lig4 leads to decreased stable transformation and enhanced homologous recombination in rice. *New Phytol* 196(4): 1048–1059.
- Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., Kang, Y., Zhao, X., Si, W., Li, W., Xiang, A. P., Zhou, J., Guo, X., Bi, Y., Si, C., Hu, B., Dong, G., Wang, H., Zhou, Z., Li, T., Tan, T., Pu, X., Wang, F., Ji, S., Zhou, Q., Huang, X., Ji, W. & Sha, J. 2014. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 156(4): 836–843.
- Niu, Y., Tenney, K., Li, H. & Gimble, F. S. 2008. Engineering variants of the I-SceI homing endonuclease with strand-specific and site-specific DNA-nicking activity. *J Mol Biol* 382(1): 188–202.
- Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W. & Doudna, J. A. 2014. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat Struct Mol Biol* 21(6): 528–534.
- Nuñez, J. K., Lee, A. S. Y., Engelman, A. & Doudna, J. A. 2015. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature* 519(7542): 193–198.
- Orel, N., Kyryk, A. & 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(5): 604–612.
- Osakabe, K., Osakabe, Y. & Toki, S. 2010. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(26): 12034–12039.
- Pacher, M., Schmidt-Puchta, W. & Puchta, H. 2007. Two unlinked double-strand breaks can induce reciprocal exchanges in plant genomes via homologous recombination and nonhomologous end joining. *Genetics* 175(1): 21–29.
- Palmer, S., Schildkraut, E., Lazarin, R., Nguyen, J. & Nickoloff, J. A. 2003. Gene conversion tracts in *Saccharomyces cerevisiae* can be extremely short and highly directional. *Nucleic Acids Res* 31(4): 1164–1173.
- Paszkowski, J., Baur, M., Bogucki, A. & Potrykus, I. 1988. Gene targeting in plants. *EMBO J* 7(13): 4021–4026.
- Paszkowski, J., Shillito, R. D., Saul, M., Mandák, V., Hohn, T., Hohn, B. & Potrykus, I. 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J* 3(12): 2717–2722.
- Paterson, A. H., Freeling, M., Tang, H. & Wang, X. 2010. Insights from the comparison of plant genome sequences. *Annu Rev Plant Biol* 61: 349–372.
- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A. & Liu, D. R. 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 31(9): 839–843.
- Pavletich, N. P. & Pabo, C. O. 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252(5007): 809–817.
- Peng, D., Kurup, S. P., Yao, P. Y., Minning, T. A. & Tarleton, R. L. 2015. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio* 6(1): e02097–e02014.
- Perrin, A., Buckle, M. & Dujon, B. 1993. Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on

- its site and on intron-exon junctions. *EMBO J* 12(7): 2939–2947.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W. & Obe, G.** 2000. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15(4): 289–302.
- Piatek, A., Ali, Z., Baazim, H., Li, L., Abulfaraj, A., Al-Shareef, S., Aouida, M. & Mahfouz, M. M.** 2015. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol J* 13(4): 578–589.
- Port, F., Chen, H.-M., Lee, T. & Bullock, S. L.** 2014. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(29): E2967–E2976.
- Porteus, M. H. & Baltimore, D.** 2003. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 300(5620): 763.
- Prado, F. & Aguilera, A.** 1995. Role of reciprocal exchange, one-ended invasion crossover and single-strand annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: different requirements for the RAD1, RAD10, and RAD52 genes. *Genetics* 139(1): 109–123.
- Puchta, H.** 2005. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* 56(409): 1–14.
- Puchta, H.** 2015. Using CRISPR/Cas in three dimensions: Towards synthetic plant genomes, transcriptomes and epigenomes. *Plant J* DOI: 10.1111/tpj.13100.
- Puchta, H., Dujon, B. & 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(22): 5034–5040.
- Puchta, H., Dujon, B. & 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 U S A* 93(10): 5055–5060.
- Puchta, H. & Fauser, F.** 2013. Gene targeting in plants: 25 years later. *Int J Dev Biol* 57(6-8): 629–637.
- Puchta, H. & Fauser, F.** 2014. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant J* 78(5): 727–741.
- Puchta, H., Swoboda, P., Gal, S., Blot, M. & Hohn, B.** 1995. Somatic intrachromosomal homologous recombination events in populations of plant siblings. *Plant Mol Biol* 28(2): 281–292.
- Qi, Y., Zhang, Y., Zhang, F., Baller, J. A., Cleland, S. C., Ryu, Y., Starker, C. G. & Voytas, D. F.** 2013. Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in *Arabidopsis* by manipulating DNA repair pathways. *Genome Res* 23(3): 547–554.
- Ramirez, C. L., Certo, M. T., Mussolino, C., Goodwin, M. J., Cradick, T. J., McCaffrey, A. P., Cathomen, T., Scharenberg, A. M. & Joung, J. K.** 2012. Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res* 40(12): 5560–5568.
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Sharp, P. A. & Zhang, F.** 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520(7546): 186–191.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y. & Zhang, F.** 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154(6): 1380–1389.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P. & Lopez, B. S.** 2009. Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 16(8): 819–824.
- Recker, J., Knoll, A. & Puchta, H.** 2014. The *Arabidopsis thaliana* homolog of the helicase RTEL1 plays multiple roles in preserving genome stability. *Plant Cell* 26(12): 4889–4902.
- Reyon, D., Tsai, S. Q., Khayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D. & Joung, J. K.** 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol* 30(5): 460–465.

- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. & Lahaye, T. 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 318(5850): 645–648.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. & Mesirov, J. P. 2011. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29(1): 24–26.
- Roth, N., Klimesch, J., Dukowic-Schulze, S., Pacher, M., Mannuss, A. & Puchta, H. 2012. The requirement for recombination factors differs considerably between different pathways of homologous double-strand break repair in somatic plant cells. *Plant J* 72(5): 781–790.
- Salomon, S. & Puchta, H. 1998. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J* 17(20): 6086–6095.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Aufl.
- Sander, J. D., Reyon, D., Maeder, M. L., Foley, J. E., Thibodeau-Beganny, S., Li, X., Regan, M. R., Dahlborg, E. J., Goodwin, M. J., Fu, F., Voytas, D. F., Joung, J. K. & Dobbs, D. 2010. Predicting success of oligomerized pool engineering (OPEN) for zinc finger target site sequences. *BMC Bioinformatics* 11: 543.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 39(21): 9275–9282.
- Sargent, R. G., Brenneman, M. A. & Wilson, J. H. 1997. Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol Cell Biol* 17(1): 267–277.
- Schaefer, D. G. 2001. Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr Opin Plant Biol* 4(2): 143–150.
- Schaeffer, S. M. & Nakata, P. A. 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant Sci* 240: 130–142.
- Schiml, S., Fauser, F. & Puchta, H. 2014. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J* 80(6): 1139–1150.
- Schmid-Burgk, J. L., Schmidt, T., Kaiser, V., Höning, K. & Hornung, V. 2013. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol* 31(1): 76–81.
- Segal, D. J., Beerli, R. R., Blancafort, P., Dreier, B., Effertz, K., Huber, A., Koksche, B., Lund, C. V., Magnenat, L., Valente, D. & Barbas, C. F., 3rd. 2003. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry* 42(7): 2137–2148.
- Seligman, L. M., Chisholm, K. M., Chevalier, B. S., Chadsey, M. S., Edwards, S. T., Savage, J. H. & Veillet, A. L. 2002. Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease. *Nucleic Acids Res* 30(17): 3870–3879.
- Shaked, H., Melamed-Bessudo, C. & Levy, A. A. 2005. High-frequency gene targeting in *Arabidopsis* plants expressing the yeast RAD54 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34): 12265–12269.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J. J., Qiu, J.-L. & Gao, C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31(8): 686–688.
- Shen, B., Zhang, J., Wu, H., Wang, J., Ma, K., Li, Z., Zhang, X., Zhang, P. & Huang, X. 2013. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res* 23(5): 720–723.
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X. & Skarnes, W. C. 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods* 11(4): 399–402.
- Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKelver, R. C., Moehle, E. A., Worden, S. E., Mitchell, J. C., Arnold, N. L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V. M., Rock, J. M., Wu, Y.-Y., Katibah, G. E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M. A., Blakeslee, B., Greenwalt, S. A., Butler, H. J., Hinkley, S. J., Zhang, L., Rebar, E. J.,

- Gregory, P. D. & Urnov, F. D.** 2009. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459(7245): 437–441.
- Shuman, S. & Glickman, M. S.** 2007. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol* 5(11): 852–861.
- Siebert, R. & Puchta, H.** 2002. Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell* 14(5): 1121–1131.
- Sizova, I., Greiner, A., Awasthi, M., Kateriya, S. & Hegemann, P.** 2013. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J* 73(5): 873–882.
- Small, I.** 2007. RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Curr Opin Biotechnol* 18(2): 148–153.
- Smith, C., Gore, A., Yan, W., Abalde-Atristain, L., Li, Z., He, C., Wang, Y., Brodsky, R. A., Zhang, K., Cheng, L. & Ye, Z.** 2014. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell* 15(1): 12–13.
- Smith, E. F. & Townsend, C. O.** 1907. A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25(643): 671–673.
- Smith, J., Berg, J. M. & Chandrasegaran, S.** 1999. A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme. *Nucleic Acids Res* 27(2): 674–681.
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F. G., Reddy, A. R., Chandrasegaran, S. & Carroll, D.** 2000. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res* 28(17): 3361–3369.
- Sorek, R., Lawrence, C. M. & Wiedenheft, B.** 2013. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem* 82: 237–266.
- Steinert, J., Schiml, S., Fauser, F. & Puchta, H.** 2015. Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J* 84: 1295–1305.
- Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J. & Mateo, J. L.** 2015. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* 10(4): e0124633.
- Stern, M. J., Ames, G. F., Smith, N. H., Robinson, E. C. & Higgins, C. F.** 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37(3): 1015–1026.
- Steuer, S., Pingoud, V., Pingoud, A. & Wende, W.** 2004. Chimeras of the homing endonuclease PI-SceI and the homologous *Candida tropicalis* intein: a study to explore the possibility of exchanging DNA-binding modules to obtain highly specific endonucleases with altered specificity. *Chembiochem* 5(2): 206–213.
- Stoddard, B. L.** 2005. Homing endonuclease structure and function. *Q Rev Biophys* 38(1): 49–95.
- Straimer, J., Lee, M. C. S., Lee, A. H., Zeitler, B., Williams, A. E., Pearl, J. R., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Llinás, M., Urnov, F. D. & Fidock, D. A.** 2012. Site-specific genome editing in *Plasmodium falciparum* using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Methods* 9(10): 993–998.
- Sugisaki, H. & Kanazawa, S.** 1981. New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanokoites* (FokI) and *Micrococcus luteus* (MluI). *Gene* 16(1-3): 73–78.
- Sung, P. & Klein, H.** 2006. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(10): 739–750.
- Swoboda, P., Gal, S., Hohn, B. & Puchta, H.** 1994. Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *EMBO J* 13(2): 484–489.
- Szczeppek, M., Brondani, V., Büchel, J., Serrano, L., Segal, D. J. & Cathomen, T.** 2007. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 25(7): 786–793.
- Thompson, A. J., Yuan, X., Kudlicki, W. & Herrin, D. L.** 1992. Cleavage and recognition pattern of a double-strand-specific endonuclease (I-creI) encoded by the chloroplast 23S rRNA intron of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* 119(2): 247–251.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P.** 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-

7 Literaturverzeichnis

- performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 14(2): 178–192.
- Townsend, J. A., Wright, D. A., Winfrey, R. J., Fu, F., Maeder, M. L., Joung, J. K. & Voytas, D. F.** 2009. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459(7245): 442–445.
- Tsai, S. Q., Wyvekens, N., Khayter, C., Foden, J. A., Thapar, V., Reyon, D., Goodwin, M. J., Aryee, M. J. & Joung, J. K.** 2014. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 32(6): 569–576.
- Tsai, S. Q., Zheng, Z., Nguyen, N. T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., Wyvekens, N., Khayter, C., Iafrate, A. J., Le, L. P., Aryee, M. J. & Joung, J. K.** 2015. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* 33(2): 187–197.
- Tzfira, T., Frankman, L. R., Vaidya, M. & Citovsky, V.** 2003. Site-specific integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA via double-stranded intermediates. *Plant Physiol* 133(3): 1011–1023.
- Uanschou, C., Siwec, T., Pedrosa-Harand, A., Kerzendorfer, C., Sanchez-Moran, E., Novatchkova, M., Akimcheva, S., Woglar, A., Klein, F. & Schlögelhofer, P.** 2007. A novel plant gene essential for meiosis is related to the human CtIP and the yeast COM1/SAE2 gene. *EMBO J* 26(24): 5061–5070.
- Upadhyay, S. K., Kumar, J., Alok, A. & Tuli, R.** 2013. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda)* 3(12): 2233–2238.
- Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y.-L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D. & Holmes, M. C.** 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435(7042): 646–651.
- Vaughn, J. N. & Bennetzen, J. L.** 2014. Natural insertions in rice commonly form tandem duplications indicative of patch-mediated double-strand break induction and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(18): 6684–6689.
- Vaze, M. B., Pellicoli, A., Lee, S. E., Ira, G., Liberi, G., Arbel-Eden, A., Foiani, M. & Haber, J. E.** 2002. Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell* 10(2): 373–385.
- Veres, A., Gosis, B. S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Cowan, C. A., Talkowski, M. E. & Musunuru, K.** 2014. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell* 15(1): 27–30.
- Voytas, D. F.** 2013. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol* 64: 327–350.
- Voytas, D. F. & Gao, C.** 2014. Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biol* 12(6): e1001877.
- Vriend, L. E. M., Jasin, M. & Krawczyk, P. M.** 2014. Assaying break and nick-induced homologous recombination in mammalian cells using the DR-GFP reporter and Cas9 nucleases. *Methods Enzymol* 546: 175–191.
- Wah, D. A., Bitinaite, J., Schildkraut, I. & Aggarwal, A. K.** 1998. Structure of FokI has implications for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10564–10569.
- Walbot, V.** 1992. Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. *Annu Rev Plant Phys* 43: 49–78.
- Walker, J. R., Corpina, R. A. & Goldberg, J.** 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412(6847): 607–614.
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H. & Iliakis, G.** 2006. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* 34(21): 6170–6182.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. & Qiu, J.-L.** 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32(9): 947–951.
- Wang, Z.-P., Xing, H.-L., Dong, L., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Wang, X.-C. & Chen, Q.-J.** 2015. Egg cell-specific

- promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. *Genome Biol* 16: 144.
- Weber, J., Öllinger, R., Friedrich, M., Ehmer, U., Barenboim, M., Steiger, K., Heid, I., Mueller, S., Maresch, R., Engleitner, T., Gross, N., Geumann, U., Fu, B., Segler, A., Yuan, D., Lange, S., Strong, A., de la Rosa, J., Esposito, I., Liu, P., Cadiñanos, J., Vassiliou, G. S., Schmid, R. M., Schneider, G., Unger, K., Yang, F., Braren, R., Heikenwälder, M., Varela, I., Saur, D., Bradley, A. & Rad, R. 2015. CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(45): 13982–13987.
- Wehrkamp-Richter, S., Degroote, F., Laffaire, J.-B., Paul, W., Perez, P. & Picard, G. 2009. Characterisation of a new reporter system allowing high throughput in planta screening for recombination events before and after controlled DNA double strand break induction. *Plant Physiol Biochem* 47(4): 248–255.
- Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, C. I., Rendtlew Danielsen, J. M., Yang, Y.-G. & Qi, Y. 2012. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell* 149(1): 101–112.
- West, C. E., Waterworth, W. M., Jiang, Q. & Bray, C. M. 2000. Arabidopsis DNA ligase IV is induced by gamma-irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant J* 24(1): 67–78.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H. & Doudna, J. A. 2012. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482(7385): 331–338.
- Wolfe, S. A., Nekludova, L. & Pabo, C. O. 2000. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 183–212.
- Woo, J. W., Kim, J., Kwon, S. I., Corvalán, C., Cho, S. W., Kim, H., Kim, S.-G., Kim, S.-T., Choe, S. & Kim, J.-S. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*.
- Wright, D. A., Townsend, J. A., Winfrey, R. J., Jr, Irwin, P. A., Rajagopal, J., Lonosky, P. M., Hall, B. D., Jondle, M. D. & Voytas, D. F. 2005. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J* 44(4): 693–705.
- Wu, X., Scott, D. A., Kriz, A. J., Chiu, A. C., Hsu, P. D., Dadon, D. B., Cheng, A. W., Trevino, A. E., Konermann, S., Chen, S., Jaenisch, R., Zhang, F. & Sharp, P. A. 2014a. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 32(7): 670–676.
- Wu, Y., Gao, T., Wang, X., Hu, Y., Hu, X., Hu, Z., Pang, J., Li, Z., Xue, J., Feng, M., Wu, L. & Liang, D. 2014b. TALE nickase mediates high efficient targeted transgene integration at the human multi-copy ribosomal DNA locus. *Biochem Biophys Res Commun* 446(1): 261–266.
- Wyvekens, N., Topkar, V. V., Khayter, C., Joung, J. K. & Tsai, S. Q. 2015. Dimeric CRISPR RNA-Guided FokI-dCas9 Nucleases Directed by Truncated gRNAs for Highly Specific Genome Editing. *Hum Gene Ther* 26(7): 425–431.
- Xie, A., Kwok, A. & Scully, R. 2009. Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* 16(8): 814–818.
- Xie, K., Minkenberg, B. & Yang, Y. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(11): 3570–3575.
- Xie, K. & Yang, Y. 2013. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant* 6(6): 1975–1983.
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C. & Chen, Q.-J. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol* 14: 327.
- Xu, P., Zhang, Y., Kang, L., Roossinck, M. J. & Mysore, K. S. 2006. Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol* 142(2): 429–440.
- Yang, B., Zhu, W., Johnson, L. B. & White, F. F. 2000. The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv.

7 Literaturverzeichnis

- oryzae is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17): 9807–9812.
- Yosef, I., Goren, M. G. & Qimron, U. 2012. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 40(12): 5569–5576.
- Zhang, F., Maeder, M. L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J. P., Reyon, D., Christian, M., Li, X., Pierick, C. J., Dobbs, D., Peterson, T., Joung, J. K. & Voytas, D. F. 2010. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(26): 12028–12033.
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N. & Zhu, J.-K. 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J* 12(6): 797–807.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W.-L., Chen, H., Henderson, I. R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E. & Ecker, J. R. 2006. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126(6): 1189–1201.
- Zhang, Y., Hefferin, M. L., Chen, L., Shim, E. Y., Tseng, H.-M., Kwon, Y., Sung, P., Lee, S. E. & Tomkinson, A. E. 2007. Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 14(7): 639–646.
- Zhang, Y., Zhang, F., Li, X., Baller, J. A., Qi, Y., Starker, C. G., Bogdanove, A. J. & Voytas, D. F. 2013. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol* 161(1): 20–27.
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D. P., Spalding, M. H. & Yang, B. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res* 42(17): 10903–10914.
- Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E. Y., Lee, S. E. & Ira, G. 2008. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* 134(6): 981–994.

8 Anhang

8.1 Plasmide

Tabelle 8.1: Liste aller verwendeten oder hergestellten Plasmide.

Plasmid	Resistenz Bakterium	Resistenz Pflanze	Quelle
pADH-o20	Spectinomycin	Kanamycin	
pADH-o50	Spectinomycin	Kanamycin	
pADH-o100	Spectinomycin	Kanamycin	
pADH-s20	Spectinomycin	Kanamycin	
pADH-s50	Spectinomycin	Kanamycin	
pADH-s100	Spectinomycin	Kanamycin	
pCAS9-TPC	Spectinomycin	PPT	Fauser <i>et al.</i> (2014)
pChimera	Ampicillin		Fauser <i>et al.</i> (2014)
pDe-CAS9	Spectinomycin	PPT	
pDe-CAS9-D10A	Spectinomycin	Kanamycin	
pDe-CAS9-H840A	Spectinomycin	Kanamycin	
pEn-C1.1	Ampicillin		
pEn-Chimera	Ampicillin		
pGEM®-T-Easy	Ampicillin		Promega GmbH, Mannheim
pHet-o20	Spectinomycin	Kanamycin	
pHet-o50	Spectinomycin	Kanamycin	
pHet-o100	Spectinomycin	Kanamycin	
pHet-s20	Spectinomycin	Kanamycin	
pHet-s50	Spectinomycin	Kanamycin	
pHet-s100	Spectinomycin	Kanamycin	
pInt-o20	Spectinomycin	Kanamycin	
pInt-o50	Spectinomycin	Kanamycin	
pInt-o100	Spectinomycin	Kanamycin	
pInt-s20	Spectinomycin	Kanamycin	
pInt-s50	Spectinomycin	Kanamycin	
pInt-s100	Spectinomycin	Kanamycin	
pPZP111	Chloramphenicol	Kanamycin	Hajdukiewicz <i>et al.</i> (1994)
pRTEL-Cas	Spectinomycin	PPT	
pRTEL-D10A	Spectinomycin	Kanamycin	
pRTEL-DN	Spectinomycin	Kanamycin	
pSDSA	Spectinomycin	PPT	
pSDSA-D10A	Spectinomycin	Kanamycin	
pSDSA-H840A	Spectinomycin	Kanamycin	
pSSA-KanR	Spectinomycin	Kanamycin	
pSSA-D10A	Spectinomycin	Kanamycin	
pSSA-D10A-NTS	Spectinomycin	Kanamycin	
pSW-5	Spectinomycin	PPT	Institutseigene Klonierung
pUbi-I- <i>SceI</i>	Spectinomycin	Gentamycin	Fauser <i>et al.</i> (2012)

8.2 Primer

Tabelle 8.2: Liste aller Primer. Die aufgeführten Primer wurden für PCR, Sequenzierungen oder HRM-Analysen verwendet. O = Orientierung, wobei fw = *forward* und rv = *reverse*. Sämtliche Primer wurden in einer Konzentration von 50 pmol/ μ l eingesetzt.

Primer	Sequenz 5' → 3'	O
NB25	AAACCCTAGGGATAACAGGGTAAT	rv
NB26	ATTGATTACCCTGTTATCCCTAGG	fw
SS30	GATCAAGCTTGACAACCTTAATAACACATTGCG	fw
SS31	GATCAAGCTTCAGCTTGCCAACATGGTGG	rv
SS40	CAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC TTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCTTTTTTCTTCTTCTTCGTTTCATAC	fw
SS41	CAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA TTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAATGCCAACTTTGTACAAGAAAGC	rv
SS44	ATTGGCGGCCCGCTAGGGATAACA	fw
SS45	AAACTGTTATCCCTAGGCGGCCGC	rv
SS46	ATTGGTGGGTCGACTAGGGATAAC	fw
SS47	AAAGTTATCCCTAGTCGACCCAC	rv
SS48	GTATGTATATATGTAGATCTGG	fw
SS63	GATCCCTAGGCCTGTTATCCCTAACAGTTTG	fw
SS64	GATCCCTAGGCTGGATCGGAATTATCGAACC	rv
SS98	GTA CTCTATCGGACTCGCTATCGGAACTAACTCTG	fw
SS99	CAGAGTTAGTTCCGATAGCGAGTCCGATAGAGTAC	rv
SS100	CTCTGATTACGATGTTGATGCTATCGTGCCACAGTCATTC	fw
SS101	GAATGACTGTGGCACGATAGCATCAACATCGTAATCAGAG	rv
SS116	ATTGAGAGTTTTCCCGATTCCCGT	fw
SS117	AAACACGGGAACTGGGAAAACCTCT	rv
SS118	ATTGCTTAGCCTGGCGAAAGAGTC	fw
SS119	AAACGACTCTTTCCGCCAGGCTAAG	rv
SS135	CAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC TTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTACGCGTCCCTGAGGCTTTTTTCTTCTT CTTCGTTTCATAC	fw
SS136	CAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA TTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTCAGGACGCGTTAATGCCAACTTT GTACAAGAAAGC	rv
SS148	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACTCTCGTGCCTTACACTGACCATTTGG	fw
SS149	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACATACGCGTCGTTACACTGACCATTTGG	fw
SS150	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCAAGCACCACCATCTTAGG	rv
SS153	GAAGTTAGACTTGAAGTTAGG	rv
SS184	CGTTCACACTGACCATTTGG	fw
SS185	GACGCATAAACTATGGTGGG	rv
SS186	ATTGATCGGCAACACATGATCTCC	fw
SS187	AAACGGAGATCATGTGTTGCCGAT	rv
SS188	ATTGCATGTGTTGCCGATCTTTAC	fw
SS189	AAACGTAAAGATCGGCAACACATG	rv
SS190	ATTGGGAGTGTCGTCATTGCCACT	fw
SS191	AAACAGTGGCAATGACGACTCC	rv
SS192	ATTGAGGATCAACACCGAGCGAGG	fw
SS193	AAACCCTCGCTCGGTGTTGATCCT	rv
SS194	ATTGATCGGCAACACATGATCTCC	fw
SS195	AAACGGAGATCATGTGTTGCCGAT	rv
SS196	ATTGCCACATTCTCCGGTAAAGAT	fw
SS197	AAACATCTTTACCGGAGAATGTGG	rv

Tabelle 8.2: Fortsetzung

Primer	Sequenz 5' → 3'	O
SS198	ATTGACATGTTTGATTCCCTCCGAG	fw
SS199	AAACCTCGGAGGAATCAAACATGT	rv
SS200	ATTGGTGAATCATCCCTCCTCGCT	fw
SS201	AAACAGCGAGGAGGGATGATTCAC	rv
SS202	ATTGTGGACTCACGGGCCGGCCAA	fw
SS203	AAACTGGCCGGCCCGTGAGTCCA	rv
SS204	ATTGGGCCCGTGAGTCCAAGAAGA	fw
SS205	AAACTCTTCTTGACTCACGGGCC	rv
SS206	ATTGTTTGGACGATTTCTTTGTTG	fw
SS207	AAACCAACAAGAAATCGTCCAAA	rv
SS208	ATTGAGTTCATACTTACCCATAAT	fw
SS209	AAACATTATGGGTAAGTATGAACT	rv
SS210	ATTGTTTCATAGTAGGCCTTTGGC	fw
SS211	AAACGCCAAAGGCCTACTATGAAA	rv
SS212	ATTGTTGGAGAGAGTCCCATCTCG	fw
SS213	AAACCGAGATGGGACTCTCTCCAA	rv
SS214	ATTGGATGGGACTCTCTCCAAGGT	fw
SS215	AAACACCTTGGAGAGAGTCCCATC	rv
SS216	ATTGGCTGTACTCTTGCCATCATC	fw
SS217	AAACGATGATGGCAAGAGTACAGC	rv
SS218	ATTGCTACTATAGCCTACTAGCTT	fw
SS219	AAACAAGCTAGTAGGCTATAGTGA	rv
SS220	ATTGTTCTGTGAACACCACGAGAT	fw
SS221	AAACATCTCGTGGTGTTCACAGAA	rv
SS280	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTAGACTAGACACTAATCTTCTTTGCTTCG	fw
SS281	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACGAGTATGACACTAATCTTCTTTGCTTCG	fw
SS282	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACTCTCGTGACACTAATCTTCTTTGCTTCG	fw
SS283	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGAGACGAGACACTAATCTTCTTTGCTTCG	fw
SS284	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCGTCGCTCGACACTAATCTTCTTTGCTTCG	fw
SS285	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACATACGCGTACACTAATCTTCTTTGCTTCG	fw
SS286	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGACCTTTCTTGGGTTTAGCC	rv
SS287	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCGAGTATGTTATTTTGTCTCTTTGATCTC	fw
SS288	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACTACTATGTGTTATTTTGTCTCTTTGATCTC	fw
SS289	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACTGTACAGTGTATTTTGTCTCTTTGATCTC	fw
SS290	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACTATACTGTTATTTTGTCTCTTTGATCTC	fw
SS291	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCGTCGTCTGTTATTTTGTCTCTTTGATCTC	fw
SS292	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTACGCTATGTTATTTTGTCTCTTTGATCTC	fw
SS293	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGTTGTAATTGTACTAAATGTTCC	rv
SS294	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATAGAGTACTAGCCAAATTGCTTGCCTAGC	fw
SS295	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACGCTACGTAGCCAAATTGCTTGCCTAGC	fw
SS296	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGTAGACGTAGCCAAATTGCTTGCCTAGC	fw
SS297	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGACGTGACTAGCCAAATTGCTTGCCTAGC	fw
SS298	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACACACACTAGCCAAATTGCTTGCCTAGC	fw
SS299	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACAGTGTAGCCAAATTGCTTGCCTAGC	fw
SS300	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAATCTGGTTTGAATTGTTCC	rv

8.3 Rohdaten der quantitativen GUS-Messungen

Tabelle 8.3: Rohdaten der Abbildung 3.7. Angegeben sind die relativen Fluoreszenzen nach 10 min Inkubation.

Replikant	Col-0	DGU.US	IU.GUS	DGU.US::		DGU.US::		IU.GUS::	
				Cas9	Cas9- D10A	I-SceI	Cas9	Cas9- D10A	I-SceI
1	888	745	451	26513	199983	71126	8590	45925	17586
2	1721	691	1079	69326	238604	113127	8268	11390	19816
3	1101,5	719,5	599,5	50589,5	215796,5	50831,5	9365,5	18903,5	21182,5
\bar{x}	1236,8	718,5	709,8	48809,5	218127,8	78361,5	8741,2	25406,2	19528,2
σ	432,7	27	328,2	21461,9	19415,8	31771,8	564,1	18162,6	1815,4

Tabelle 8.4: Rohdaten der Abbildung 3.8. Angegeben sind relative Fluoreszenzen der drei Replikate (R1-R3).

Zeit (min)	DGU.US::Cas9-D10A					DGU.US::Cas9-D10A-NTS				
	R1	R2	R3	\bar{x}	σ	R1	R2	R3	\bar{x}	σ
5	19345	10479	15658	15160,7	3636,7	10715	9992	7984	9563,7	1155,5
10	37378	19713	32826	29972,3	7488,7	37013	21060	17056	25043	8620,7
15	57602	31453	47478	45511	10765,6	54426	31519	27605	37850	11829,6
20	75659	41849	63134	60214	13956,5	71281	42660	39399	51113,3	14322,9
25	93868	51558	72329	72585	17274	88180	53630	52515	64775	16556,3
30	109455	60940	94049	88148	20241	103586	65381	61152	76706,3	19085,2
45	151956	88364	114006	118108,7	26123	146733	96909	94192	112611,3	24153,3
60	186909	111857	154880	151215,3	30749,3	181692	127726	124865	144761	26140,4
90	247137	152624	220768	206843	39821,4	239738	176799	177755	198097,3	29447,2
120	292115	187962	266749	248942	44345,5	286780	214379	226356	242505	31686,8

Tabelle 8.5: Rohdaten der Abbildung 3.9. Angegeben sind relative Fluoreszenzen der drei Replikate (R1-R3).

Zeit (min)	IU.GUS::Cas9-D10A					IU.GUS::Cas9-H840A				
	R1	R2	R3	\bar{x}	σ	R1	R2	R3	\bar{x}	σ
5	7675	13556	19790	13673,7	4946,4	3167	5224	4885	4425,3	900,3
10	47381	32930	45594	41968,3	6432,6	7415	5843	5457	6238,3	847
15	71870	33784	73913	59855,7	18454,3	8170	6472	6112	6918	897,6
20	96432	73315	99621	89789,3	11721,6	9011	7064	6963	7679,3	942,7
25	118030	89360	122942	110110,7	14809,3	10019	7955	7910	8628	983,9
30	136661	107515	142906	129027,3	15423,7	7664	8318	5837	7273	1050,1
45	184325	144080	189667	172690,7	20348	13724	10536	11489	11916,3	1336,3
60	224392	173378	231924	209898	26005,9	16246	12680	14377	14434,3	1456,5
90	281873	227089	290546	266502,7	28093,7	21399	16950	20112	19487	1869,3
120	321876	264515	337901	308097,3	31504,1	24530	20548	23678	22918,7	1712,1

8.4 Nachweis hereditärer Mutationen von gepaarten SSBs

Tabelle 8.6: Segregationsanalyse transgener T2 Linien. *Single locus* Linien sollten korrekt auf Selektionsmedium 3:1 segregieren. Korrekte Segregation kann für $\chi^2 < 3,84$ angenommen werden.

T1 Pflanze #	tot	gewachsen	χ^2	Bewertung
1	17	35	1,64	3:1
2	10	42	0,92	3:1
3	15	37	0,41	3:1
4	8	44	2,56	3:1
5	17	35	1,64	3:1
6	14	38	0,1	3:1
7	16	36	0,92	3:1
8	13	39	0	3:1
9	12	40	0,10	3:1
10	7	45	3,69	
11	2	50	12,41	
12	11	41	0,41	3:1
13	3	49	10,26	
14	27	25	20,1	
15	13	39	0	3:1
16	11	41	0,41	3:1
17	18	34	2,56	3:1
18	19	33	3,69	
19	17	35	1,64	3:1
20	15	37	0,41	3:1
21	1	51	14,77	
22	16	36	0,92	3:1
23	16	36	0,92	3:1
24	10	42	0,92	3:1
25	2	50	12,41	
26	7	45	3,69	
27	3	49	10,26	
28	14	38	0,1	3:1
29	16	36	0,92	3:1
30	0	52	17,33	

8.5 NGS Daten der Analyse gepaarter SSBs

Tabelle 8.7: Übersicht über *Read* Anzahlen der Analyse gepaarter SSBs auf beiden DNA-Strängen.

Konstrukt	<i>Reads</i>
ADH-o20	9364
ADH-o50	5708
ADH-o100	9437
Int-o20	20.746
Int-o50	12.520
Int-o100	11.003
Het-o20	16.433
Het-o50	6755
Het-o100	10.393

Anhang

```
>Het_ref TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGCTGTACTCTTGCCATCATAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCACTATAGCCTACTAGCTTGGTATCT
50 bp Distanz
>JN35DQ101CCTAR TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGATG*TACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
GGACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTG
GGACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGATG
GGACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTG
>JN35DQ101D08F TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGATG*TACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
GACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGTA
TAGGAAATGTGAC
TCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGTA
TAGGAAATGTGACCGGCTG
>JN35DQ101A4IK4 TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
TAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTT
GATGGGACTCTCTC-CAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTT
GATGGGACTCTCTC
>JN35DQ101APMX4 TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGAC*CGGCTGTACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
TCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCT
CTCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCT
CTCCAAGTAGGAAATGTGAC
>JN35DQ101B991A TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGAC*CGGCTGTACTCTTGCCATCATCAGGATCAACA-TTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTAT
TCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTT
GACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGAC
TCTCCCAAGTAGGAAATGTGAC
>JN35DQ101BH673 TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGG*CTGTACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
ACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGG
ACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGG
ACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGG
>JN35DQ101DXT2L TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
TGGACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGA
TGGACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGA
TGGACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGA
>JN35DQ101BTRCN TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTG*CCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
GTAGGAAATGTGACCGGCT
CTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTG
GTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTG
>JN35DQ101B55DO TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCA*TCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
CTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCA
CTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCA
>JN35DQ101BDKCG TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCT*TGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
CTCCAAGTAGGAAATGTGACCGG
GTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCT
CTCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCT
100 bp Distanz
>JN35DQ101D4VK6 TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCT*ACTAGCTTTGGTATC
CTCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCT
>JN35DQ101CNOA2 TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAG*CTTTGGTATC
AATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAG
>JN35DQ101C0E0V TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTA*CTAGCTTTGGTATC
GGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTA
>JN35DQ101A012E TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGT*TGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
CCCATCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGT
>JN35DQ101BSJDD TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCT*TGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGT*TCACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
CTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGA
>JN35DQ101BTRZ2 TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTG*CTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
AAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTG
>JN35DQ101DOMGH TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTACT*ATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
GTACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACT
>JN35DQ101AEJD4 TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTAC*TAGCTTTGGTATC
CATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTAC
>JN35DQ101DL5EW TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTAC*TAGCTTTGGTATC
CATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTAC
>JN35DQ101AT504 TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTAC*TAGCTTTGGTATC
CATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTAC
>JN35DQ101CE0SN TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGT*TGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
CATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTAC
>JN35DQ101CM0AB TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGT*CTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
ACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGG
>JN35DQ101AD3KX TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGT*CTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
ACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGT
>JN35DQ101AZWC9 TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTA*CTAGCTTTGGTATC
TGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTGTGGTTGCTGCTACTATAGCCTA
>JN35DQ101CU91T TTGCCATTGTTCTTGTGTTCTGTGAACACCACGAGATGGGACTCTCTCCAAGGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTG*GGTTGCTGCTACTATAGCCTACTAGCTTTGGTATC
ACTCTCCCAAGTAGGAAATGTGACCGGCTGACTCTTGCCATCATCAGGATCAACATTG
```

Abbildung 8.2: Insertionen im Heterochromatin nach Induktion von SSBs auf beiden DNA-Strängen.

Eidesstattliche Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen (Botanik II) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der Zeit von November 2012 bis November 2015 durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet habe. Die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie in der gültigen Fassung vom 09. Juli 2010 wurden beachtet. Weiterhin ist die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) dieser Regeln am Insitut gesichert.

Die elektronische Version der Arbeit stimmt mit der schriftlichen Arbeit überein.

Karlsruhe, 05.01.2016

Simon Schiml