

CRISPR/Cas9-induzierte chromosomale Veränderungen
in *Arabidopsis thaliana*

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. Natalja Beying
aus Stutensee

1. Referent: Prof. Dr. Holger Puchta

2. Referent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 21. April 2020

*„We shall require a substantially new manner of thinking
if mankind is to survive.“ – Albert Einstein*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 DNA-Schäden und ihre Reparaturmechanismen	2
1.1.1 DNA Doppelstrangbruchreparatur.....	4
1.1.1.1 Nicht-homologe Endverknüpfung (<i>Non-homologous end joining</i>).....	5
1.1.1.2 Homologe Rekombination	12
1.1.2 Entstehung großer chromosomaler Veränderungen	16
1.2 Gezielte Veränderung der DNA.....	19
1.2.1 Das natürliche CRISPR/Cas-System.....	21
1.2.2 CRISPR/Cas als biotechnologisches Werkzeug	23
1.3 Einsatz des CRISPR/Cas-Systems in der Pflanzenzüchtung: Von <i>Gene Editing</i> bis <i>Genome Engineering</i>	25
1.3.1 <i>Gene Editing</i>	26
1.3.2 <i>Genome Engineering</i>	28
1.4 Zielsetzung	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Organismen	31
2.1.2 Plasmide	32
2.1.3 Oligonukleotide	32
2.1.4 Enzyme und Enzym-Mastermixe	32
2.1.5 Chemikalien.....	33
2.1.6 Verbrauchsmaterialien und Kits.....	34
2.1.7 Medien, Lösungen und Puffer	34

Inhaltsverzeichnis

2.1.8	Antibiotika und Herbizide	36
2.1.9	Geräte und Zubehör	37
2.1.10	Software und Datenbanken	39
2.2	Methoden.....	40
2.2.1	Pflanzen-spezifische Arbeiten.....	40
2.2.1.1	Pflanzenanzucht und Lagerung von Saatgut.....	40
2.2.1.2	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis</i> Saatgut.....	40
2.2.1.3	Kreuzungen	41
2.2.1.4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Transformation von <i>Arabidopsis</i>	41
2.2.1.5	Phänotypenanalysen und Fertilitätstests.....	42
2.2.1.1	Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in <i>A. thaliana</i>	42
2.2.2	Mikrobiologische Arbeiten	43
2.2.2.1	Transformation und Kultur von <i>Escherichia coli</i>	43
2.2.2.2	Transformation und Kultur von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
2.2.3	Molekularbiologische Arbeiten.....	44
2.2.3.1	DNA-Isolierung aus <i>Arabidopsis</i>	44
2.2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
2.2.3.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren	48
2.2.3.4	DNA-Quantifizierung.....	48
2.2.3.5	Sequenzierung.....	50
2.2.3.6	Klonierungen.....	51
2.2.3.7	Untersuchung der Cas9-Schnitteffizienz	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Experimentelles Setup zur gezielten Induktion chromosomaler Translokationen in <i>Arabidopsis</i>	54
3.1.1	Konzeption, Herstellung und Effizienzanalyse der verwendeten Cas9-Nukleasen	54
3.1.2	Quantitative Analyse der induzierten Translokationsereignisse	58
3.1.3	Qualitative Analyse der induzierten Translokationsereignisse	60
3.2	Gezielte Induktion vererbbarer Translokationen durch Eizell-spezifische Cas9-Expression und Etablierung einer homozygoten TL-Linie.....	65

3.2.1	Konzeption und Herstellung der Eizell-spezifischen Cas9-Nukleasen.....	65
3.2.2	Etablierung von TL1-2 homozygot tragenden Pflanzenlinien.....	66
3.2.2.1	Analyse von TL-Ereignissen in der T2-Generation.....	66
3.2.2.2	Analyse der Segregation bezüglich der TL in der T3-Generation.....	68
3.2.2.3	Analyse der für die TL1-2 homozygoten Linien.....	71
3.2.3	Etablierung von TL1-5 homozygot tragenden Pflanzenlinien.....	74
3.3	Analyse der Einzelstrangbruch-induzierten Homologen Rekombination.....	81
3.3.1	Konzeption und Optimierung der Versuchsdurchführung.....	81
3.3.2	Analyse der SSB-induzierten HR in <i>rad54</i> und <i>rad5a</i> Mutanten.....	83
4	Diskussion	86
4.1	Etablierung eines Systems zur gezielten Induktion chromosomaler Translokationen und deren Vererbung in <i>Arabidopsis</i>	87
4.1.1	Das CRISPR/Cas-System aus <i>S. aureus</i> kann zur gezielten Induktion von Translokationen angewandt werden.....	89
4.1.2	KU70 als limitierender Faktor für die TL-Bildung.....	92
4.1.3	In <i>Arabidopsis</i> ist der c-NHEJ Mechanismen verantwortlich für die Entstehung von Translokationen, in Abwesenheit der c-NHEJ übernimmt der alternative Weg.....	93
4.1.4	Die Eizell-spezifische Expression der Cas9-Nuklease ermöglicht die gezielte Induktion vererbbarer Translokationen sowie die Etablierung homozygoter TL-Linien durch Anwendung eines effizienten Protokolls	102
4.1.5	Ausblick.....	109
4.2	SSB-induzierte Homologe Rekombination unterscheidet sich von der DSB-induzierten HR	114
4.2.1	Die DNA-Reparaturfaktoren <i>AtRAD54</i> und <i>AtRAD5A</i> sind nicht an der SSB-induzierten HR beteiligt.....	115
4.2.2	Ausblick.....	117
5	Zusammenfassung	120
6	Summary	121
7	Referenzen	122

8	Anhang	153
8.1	Oligonukleotide, Primerkombinationen und PCR-Bedingungen.....	153
8.2	Plasmide und Referenzsequenzen	158
8.2.1	Klonierte Vektoren.....	158
8.2.2	Referenzsequenzen	158
8.3	Quellcode für die Analyse von NGS-Daten in R-Studio.....	162
8.4	Rohdaten.....	166
8.4.1	ddPCR Analyse der TL1-2.....	166
8.4.2	NGS-Daten.....	168
8.4.3	Fertilitätsanalysen.....	169
8.4.4	Nachweis der β -Glucuronidase Aktivität.....	171
	Eidesstattliche Erklärung.....	173

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Reparatur eines DSB mittels der Nicht-homologen Endverknüpfung (<i>non-homologous end joining</i> , NHEJ).	7
Abbildung 1-2: Mechanismen des <i>synthesis-dependent</i> MMEJ (SD-MMEJ).	11
Abbildung 1-3: Übersicht über die Reparaturmechanismen nach einem DSB.	13
Abbildung 1-4: Verschiedene Mechanismen zur Bildung von chromosomalen Umlagerungen.	18
Abbildung 1-5: Das natürliche CRISPR/Cas-System als adaptives Immunsystem.	21
Abbildung 1-6: Verschiedene Cas-Typen der Klasse 2 der verschiedenen CRISPR/Cas-Systeme.	23
Abbildung 1-7: Induktion großer chromosomaler Veränderungen.	28
Abbildung 2-1: Primerkombinationen zur Identifikation von Translokationsereignissen.	47
Abbildung 2-2: <i>Droplet Digital</i> PCR.	49
Abbildung 3-1: Schema der gezielten Induktion einer Translokation zwischen Chromosom 1 (Chr1) und Chromosom 2 (Chr2).	55
Abbildung 3-2: T7-Endonuklease Assay zur Überprüfung der Schnitteffizienz der <i>Sa</i> Cas9-Nuklease.	57
Abbildung 3-3: Cas9-Schnitteffizienz der beiden Protospacer auf Chr1 (PS1-1) und auf Chr2 (PS2)...	58
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der quantitativen Analyse der TL-Frequenzen mittels ddPCR.	59
Abbildung 3-5: Quantitative Analyse der TL-Frequenz.	61
Abbildung 3-6: Detaillierte Analyse der NGS-Daten bezüglich des Reparaturmusters an den <i>Junctions</i> von TL1-2 in der T1-Generation.	63
Abbildung 3-7: Klonierung des verwendeten Expressionsvektors pDe- <i>Sa</i> Cas9-ECP mit PS1-1 und PS2.	66
Abbildung 3-8: Etablierung von Linien homozygot für die TL1-2.	67
Abbildung 3-9: Schematisches Segregationsmuster einer reziproken Translokation in ihrem hemizygoten Zustand.	70
Abbildung 3-10: Sequenzierungsergebnisse beider <i>Junctions</i> der vererbbaeren Translokationsereignisse.	72
Abbildung 3-11: Molekulare und phänotypische Analyse von Pflanzen, die die TL1-2 homozygot tragen.	73
Abbildung 3-12: Schema der Induktion von Translokationen zwischen Chromosom 1 und 5 (TL1-5).75	
Abbildung 3-13: Analyse der Cas9-Schnitteffizienz.	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-14: Molekulare Analyse der für die TL1-5 homozygoten Pflanze.....	79
Abbildung 3-15: Phänotyp- und Fertilitätsanalyse von für TL1-5 homozygoten Pflanzen.	80
Abbildung 3-16: Reporterkonstrukte DGU.US und IU.GUS zum Nachweis induzierter HR.....	82
Abbildung 3-17: Bestimmung der relativen Rekombinationsfrequenz in <i>rad54</i> und <i>rad5a</i> Mutanten. .	85
Abbildung 4-1: Übersicht über die möglichen Reparaturausgänge nach der Induktion zweier DSBs auf heterologen Chromosomen.	96
Abbildung 4-2: Schemata der durch die Cas9-Nuklease aus <i>S. aureus</i> (<i>SaCas9</i>) vermittelten Translokationen.....	104
Abbildung 4-3: FISH-Analyse der etablierten Linien, die die jeweilige TL homozygot tragen.	108
Abbildung 4-4: Schema eines <i>Tethering</i> -Ansatzes zur Erhöhung der TL-Frequenz.	112
Abbildung 4-5: Modelle für die SSB-induzierte HR in den Reporterkonstrukten DGU.US und IU.GUS.	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Auflistung der verwendeten T-DNA Insertionsmutanten.	31
Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten Antibiotika und Herbizide.	36
Tabelle 3-1: Analyse vererbbarer Translokationen in der T2-Generation.	68
Tabelle 3-2: Segregationsanalyse der T3-Linien.	71
Tabelle 3-3: Segregationsanalyse der F2-Linien nach Rückkreuzung.	74
Tabelle 3-4: Etablierung der TL1-5 homozygoten Linie.	78
Tabelle 8-1: Primersequenzen.	153
Tabelle 8-2: Oligonukleotide der <i>Spacer</i> -Sequenzen zur Klonierung der T-DNA Konstrukte.	155
Tabelle 8-3: LNA-Sonden für die <i>droplet digital</i> PCR.	156
Tabelle 8-4: Primerkombinationen and PCR-Bedingungen der <i>droplet digital</i> PCR.	156
Tabelle 8-5: Primerkombinationen and PCR-Bedingungen der PCR-basierten Genotypisierung bezüglich der Translokation.	156
Tabelle 8-6: Primerkombinationen and PCR-Bedingungen zur Detektion der translozierten Chromosomenabschnitte der für die TL homozygoten Pflanzen.	157
Tabelle 8-7: In der FISH-Analyse eingesetzte BACs.	157
Tabelle 8-8: In dieser Arbeit klonierte Vektoren.	158
Tabelle 8-9: Rohdaten der ddPCR Analysen.	166
Tabelle 8-10: Rohdaten der NGS Analyse – Cas9-Schnitteffizienz.	168
Tabelle 8-11: Rohdaten der NGS Analyse – Analyse der <i>TL-Junctions</i>	168
Tabelle 8-12: Rohdaten der NGS Analyse – Deletionsgrößen, Insertionsgrößen und zur Reparatur verwendete Mikrohomologien (MH).	168
Tabelle 8-13: Fertilitätsanalyse von zwei für die TL1-2 homozygoten Linien (Col-0::EC-TL1-2).	169
Tabelle 8-14: Fertilitätsanalyse von einer für die TL1-5 homozygoten Linien (Col-0::EC-TL1-5).	170
Tabelle 8-15: Rohdaten des 4-MUG Assays.	171
Tabelle 8-16: Rohdaten des Lowry Assays.	172

Abkürzungsverzeichnis

4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
alt-NHEJ	<i>alternative</i> NHEJ (alternatives NHEJ)
c-NHEJ	<i>canonical</i> NHEJ (klassisches NHEJ)
Cas	CRISPR <i>associated</i>
Chr1 / Chr2 / Chr5	Chromosom 1 / Chromosom 2 / Chromosom 5
CR	<i>chromosomal rearrangement</i> , große chromosomale Veränderungen
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
ddPCR	<i>Droplet Digital</i> PCR
DSB	Doppelstrangbruch (<i>double strand break</i>)
EC	<i>egg cell</i> (Eizell)
gDNA	genomische DNA
GUS	β -Glucuronidase
HR	Homologe Rekombination
MH	Mikrohomologie
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> (Nicht-homologe Endverknüpfung)
TL1-2	Translokation zwischen Chr1 und Chr2
TL1-5	Translokation zwischen Chr1 und Chr5
J1 bzw. J2	Junction 1 bzw. Junction 2
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PPT	Phosphinotricin
SaCas9	Cas9 Ortholog aus <i>Staphylococcus aureus</i>
sgRNA	<i>single-guide</i> RNA
SpCas9-D10A	Cas9 Ortholog aus <i>Streptococcus pyogenes</i> , Nickase-Variante
SSB	DNA-Einzelstrangbruch (<i>single strand break</i>)
T-DNA	Transfer-DNA
TL	Translokation
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Alle Organismen dieser Erde unterliegen dem Einfluss DNA-schädigender Agenzien. Insbesondere Pflanzen sind aufgrund ihrer sessilen und phototrophen Lebensweise einer erhöhten Exposition verschiedenster Faktoren wie UV-Strahlung, standortspezifischer biotischer und abiotischer Umweltfaktoren oder reaktiver Sauerstoffspezies ausgesetzt. Werden die induzierten Schäden nicht repariert, kann dies zu verschiedenen Krankheiten oder zum Zelltod führen. Daher existiert der Selektionsdruck, das Überleben von Zellen bzw. des gesamten Organismus sicherzustellen. Aus diesem Grund haben sich DNA-Reparaturwege als Schutzmechanismen entwickelt, um die Vollständigkeit der genetischen Information zu erhalten, während trotzdem die Dynamik des genetischen Codes für weitere Evolution gewahrt wird. Dies bedeutet, dass eine zufällig und ungerichtet entstandene Mutation unter Selektionsdruck in einer Population angehäuft werden kann, wenn sie für das Überleben vorteilhaft ist. Dadurch wird die genetische Diversität erhalten und die für den Evolutionsprozess wichtige Adaption und Spezifikation entwickeln sich (Walbot, 1985).

Mutationen entstehen durch eine fehlerhafte Reparatur und haben oftmals eine direkte Ausprägung auf quantitative und qualitative Merkmale des Organismus. Werden einzelne Basen ersetzt, entfernt oder inseriert, können die den Merkmalen zugrundeliegenden Gene verändert werden. Neben der Mutation von einzelnen Nukleotiden auf Sequenzebene können auch größere strukturelle Veränderungen das Genom neu formen. Durch illegitime Paarung von ursprünglich nicht miteinander verknüpften Bruchenden können große Deletionen, Insertionen, Inversionen, Duplikationen oder Translokationen entstehen (McClintock, 1978). So können Gene zerstört, die Regulation dieser verändert, neue Fusionen erzeugt und die genetische Information neu geordnet und somit die 3D-Architektur des Genoms verändert werden. Diese großen chromosomalen Veränderungen (*chromosomal rearrangements*, CR) haben ebenfalls einen großen Einfluss auf die phänotypische Variabilität wie auch die Rekombination (Gabur *et al.*, 2019). In der Meiose kann es durch unterschiedliche Strukturvarianten zu Fehlpaarungen oder gar keiner Paarung kommen, was in Folge zu Hybriden mit verringerter Fitness oder sogar sterilen Hybriden führen kann. CR tragen also zu Fortpflanzungsbarrieren sowie der Artbildung bei (Rieseberg und Willis, 2007).

Die Menschheit nutzte diese natürliche, dynamische Variabilität schon in der klassischen Züchtung durch die Auswahl von Pflanzen mit Merkmalen, die für den Ackerbau interessant waren. Um die genetische Diversität weiter zu erhöhen, wurde Strahlung oder Chemikalien zur Steigerung der Mutationsrate eingesetzt. Da auch ungewünschte Mutationen unbemerkt an anderen Stellen im Genom

auftreten, sind diese Vorgänge der Auslese- sowie der Mutagenesezüchtung sehr aufwendig und zeitintensiv. Erste transgene Ansätze zur Genommanipulation umfassen die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte T-DNA Integration (Herrera-Estrella *et al.*, 1983) sowie die biolistische Transformation (Klein *et al.*, 1988a; Klein *et al.*, 1988b). In beiden Ansätzen wird Fremd-DNA in den Organismus eingeschleust und durch interne Mechanismen an zufälliger Stelle stabil im Genom eingebaut. So konnten unter anderem T-DNA Mutantenbanken (Alonso *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003) generiert, sowie Resistenzgene (Bsp.: Bt-Toxin in Mais) oder auch Merkmale zur Verbesserung der Nährstoffbilanz (Bsp.: Beta-Carotin in „Golden rice“) erfolgreich in Kultursorten eingeführt werden (Hartung und Schiemann, 2014). Mittels dieser Techniken konnten neue Merkmale in kürzerer Zeit und sogar aus artfremden Spezies eingeführt werden. Trotz der erhöhten Spezifität dieser Ansätze gegenüber traditioneller Züchtungsmethoden, bleibt der Integrationsort der Veränderung zufällig.

Eine schnelle und hochpräzise Genomeditierung wurde erst durch den Einsatz von synthetischen sequenzspezifischen Nukleasen möglich. Mittels dieser können Doppelstrangbrüche (DSBs) gezielt im Genom induziert und somit die DNA zielgerichtet verändert werden. Die ersten im Labor entwickelten, sequenzspezifischen Nukleasen waren gentechnisch veränderte Meganukleasen (Smith *et al.*, 2006; Arnould *et al.*, 2006; Arnould *et al.*, 2007), gefolgt von Zinkfinger-nukleasen (ZFNs) (Kim *et al.*, 1996) und *transcription activator-like* Effektor-Nukleasen (TALENs) (Boch *et al.*, 2009). Mit der Entdeckung des *clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated* (CRISPR/Cas)-Systems als biotechnologisches Werkzeug (Jinek *et al.*, 2012) wurde die Molekularbiologie revolutioniert. Im Vergleich zu ZFNs und TALENs zeichnet sich das CRISPR/Cas-System durch seine Einfachheit, Effizienz, geringen Kosten sowie durch seine Fähigkeit mehrere Gene gleichzeitig zu schneiden aus. Nach der Induktion eines DSB werden die dem Organismus eigenen Reparaturmechanismen, unterteilt in Nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) und Homologe Rekombination (HR) ausgenutzt, um Genomveränderungen einzuführen (Puchta *et al.*, 1996; Salomon und Puchta, 1998). Für eine effektive und zielgerichtete Genomeditierung ist es daher essenziell, die Mechanismen hinter Bruch-induzierten Modifikationen zu verstehen (Puchta, 2005).

1.1 DNA-Schäden und ihre Reparaturmechanismen

Pflanzen sind durch ihre sessile Lebensweise und ihren phototrophen Lebensstil ständig DNA-schädigenden Faktoren ausgesetzt. Diese können sowohl exogener wie endogener Natur sein. Zu den exogenen Einflüssen zählen neben abiotischen Faktoren, wie UV-Strahlung oder ionisierende Strahlung, auch biotische Faktoren, wie von Bakterien, Viren oder Pilzen produzierte Genotoxine

(Übersicht in Tuteja *et al.*, 2009). Endogene Schädigungen können über Stoffwechselprodukte wie reaktive Sauerstoffspezies oder über Fehler bei Prozessen der Replikation und Rekombination entstehen. Um eine schnelle und schadensspezifische Reparatur zu gewährleisten, hat sich im Laufe der Evolution ein vielfältiges und effizientes Reparaturnetzwerk entwickelt. Dies ist besonders für Pflanzen wichtig, da diese über keine prädeterminierte Keimbahn verfügen und erworbene Mutationen auch an die Nachkommen weitergegeben werden können.

Die häufigste Ursache für DNA-Schäden in Pflanzen ist die zur Energiegewinnung genutzte UV-B-Strahlung im Sonnenlicht. Hier entstehen häufig Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und (6-4)-Photoprodukte durch eine Dimerisierung von benachbarten Thyminbasen. Diese, die DNA-Doppelhelix verzerrende, Schäden können über den Mechanismus der Photoreaktivierung repariert werden. Spezialisierte Enzyme, die Photolyasen, spalten die Bindung zwischen den beiden Thyminbasen und lösen die Photoprodukte und CPDs somit auf (Sancar, 1994, Übersicht in Essen und Klar, 2006 und Kavakli *et al.*, 2019). Neben der Photoreaktivierung, die lichtabhängig und nicht in allen Organismen, wie z. B. Säugern vorhanden ist, stellt die Nukleotidexzisionsreparatur einen weiteren Reparaturweg zur Beseitigung solcher Schäden dar (Canturk *et al.*, 2016). Auch andere DNA-Läsionen wie die durch Genotoxine induzierten *bulky adducts*, welche die Konformation der Doppelhelix ändern, können über die Nukleotidexzisionsreparatur entfernt werden (Batty und Wood, 2000).

Weitere Modifikationen einzelner Basen beinhalten Oxidation, Alkylierungen, Desaminierungen oder Hydrolyse. Auch kann es zum Falscheinbau eines Nukleotids und somit der Fehlpaarung zwischen den komplementären DNA-Strängen kommen. Letztere können durch die sogenannte *mismatch*-Reparatur erkannt und entfernt werden (Iyer *et al.*, 2006; Spampinato *et al.*, 2009). Oben genannte Basenmodifikationen werden über den Mechanismus der Basenexzisionsreparatur beseitigt (Übersicht in Roldán-Arjona *et al.*, 2019). Werden die DNA-Schäden nicht rechtzeitig vor dem Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus repariert, kann dies zur Blockade der Replikation und somit zur genomischen Instabilität führen. Deshalb haben sich Schadenstoleranzmechanismen wie die Transläsionssynthese sowie die postreplikative Reparatur entwickelt, welche trotz bestehender Schäden eine vollständige Replikation gewährleisten (Übersicht in Budzowska und Kanaar, 2009 und Sakamoto, 2019). Greifen diese Mechanismen jedoch nicht, kann es zur Ausbildung eines DSB kommen. Die Reparatur dieses Schadens ist viel problematischer, da nicht wie bei den zuvor beschriebenen Schäden nur ein DNA-Strang betroffen ist, sondern beide Stränge beschädigt sind. Es liegt somit keine direkte Matrize zur fehlerfreien Reparatur vor.

1.1.1 DNA Doppelstrangbruchreparatur

Die für einen Organismus gefährlichste Form eines DNA-Schadens ist der DSB. In jeder eukaryotischen Zelle entstehen pro Tag etwa 10 DSBs (Martin *et al.*, 1985; Lieber, 2010). Ursachen dieser DSBs können spontane, oxidative Schäden, ionisierende Strahlung oder Replikationsfehler sein, aber auch zwei benachbarte Einzelstrangbrüche (*single strand breaks*, SSBs) können zu einem DSB führen (Britt, 1996). Sie können also während der DNA-Reparatur und der DNA-Replikation entstehen, aber auch gezielt während der Meiose oder der V(D)J-Rekombination auftreten (Bleuyard *et al.*, 2006). Da hier beide DNA-Einzelstränge betroffen sind, das Zucker-Phosphatrückgrat der DNA-Helix durchbrochen ist und somit kein intakter Matrizenstrang vorhanden ist, stellt die Reparatur von DSBs eine besondere Herausforderung für den Organismus dar. DSBs sind mit Deletionen, Insertionen oder auch der Umstrukturierung ganzer Chromosomen durch Verlust oder Fusion von Fragmenten assoziiert (Waterworth *et al.*, 2011).

Um die Integrität der DNA zu bewahren, hat sich in eukaryotischen Zellen ein komplexes System zur Reparatur von DSBs entwickelt. Die Schadenserkenkung und die darauffolgende Zellantwort werden im Rahmen des Zellzyklus reguliert und koordiniert (Übersicht in Hu *et al.*, 2016). Tritt ein DNA-Schaden auf, wird dieser zunächst vom MRN-Komplex (MRE11-RAD50-NBS1-Komplex) erkannt und anschließend die Kinasen ATM und ATR zur beschädigten Stelle rekrutiert. Die ATM-Kinase wird hauptsächlich in Folge eines DSB aktiviert, während die ATR-Kinase für die Reaktion auf Ereignisse, die einen Einzelstrang betreffen und den Fortschritt der DNA-Replikationsgabel beeinflussen, von entscheidender Bedeutung ist (Abraham, 2001; Yoshiyama *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2019). Über Phosphorylierungs-Kaskaden kommt es anschließend zur Modifikation von vielen weiteren Faktoren. Hierzu zählt auch die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX, wodurch cytologisch nachweisbare γ H2AX-Foci entstehen (Dickey *et al.*, 2009; van Attikum und Gasser, 2009; Amiard *et al.*, 2011). Diese primäre Signaltransduktion resultiert im Zellzyklusarrest und der Aktivierung und Rekrutierung weiterer Faktoren zur Reparatur des Schadens, wie auch dem Transkriptionsfaktor SOG1 und einer weiteren Kinase WEE1 (Yoshiyama *et al.*, 2009; Schutter *et al.*, 2007).

Die Doppelstrangbruchreparatur lässt sich in zwei unterschiedliche Hauptreparaturwege einteilen – die Nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR) (Puchta, 2005), wobei diese sich wiederum in mehrere Nebenwege unterteilen lassen. Die DNA-Reparaturwege sind stark konserviert zwischen Säugern und Pflanzen. Die Wahl zwischen diesen Wegen hängt von der Phase des Zellzyklus und der Einleitung der DNA-Endresektion

ab (Ceccaldi *et al.*, 2016; Grabarz *et al.*, 2012; Kakarougkas und Jeggo, 2014). So ist die NHEJ während des gesamten Zellzyklus mit Ausnahme der Mitose aktiv, während die HR auf bestimmte Phasen beschränkt ist. Außerdem kann die direkte Endverknüpfung schneller abgeschlossen werden als die HR und unterdrückt zudem die HR. Damit ist die NHEJ der vorherrschende Reparaturweg in somatischen Pflanzenzellen (Puchta, 2005). Der zweite bestimmende Faktor für die Wahl des Reparaturweges ist die Prozessierung von DSB-Enden von geraden Brüchen (*blunt ends*) zu Überhängen mittels 5'- zu 3'-Resektion (Ranjha *et al.*, 2018; Yeh *et al.*, 2019). Unbearbeitete DSBs werden über NHEJ repariert, wohingegen nach einer Resektion Homologien freigelegt werden können, die für die Reparatur entweder durch alternative NHEJ oder HR genutzt werden. Im Folgenden werden die beiden Hauptreparaturwege der DSB-Reparatur, NHEJ und HR, genauer beschrieben.

1.1.1.1 Nicht-homologe Endverknüpfung (*Non-homologous end joining*)

Bei der NHEJ werden prinzipiell die beiden Bruchenden eines DSB ohne die Verwendung eines homologen DNA-Moleküls wieder zusammengefügt. Hierbei kann es zu kleinen Insertionen, Deletionen oder einer Kombination beider Ereignisse (Indels) kommen (Salomon und Puchta, 1998). Daher wird dieser Reparaturmechanismus in der Regel als ungenau und fehlerbehaftet beschrieben (Charbonnel *et al.*, 2010). Analysen in Säugern weisen jedoch darauf hin, dass ein erheblicher Teil der NHEJ ohne den Verlust von Sequenzinformation abläuft (Geisinger *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2018; Shou *et al.*, 2018). Trotz der Fehleranfälligkeit beschreibt die NHEJ einen Hauptweg der DSBR und ist in höheren Eukaryoten der vorherrschende DNA-Reparaturmechanismus. NHEJ lässt sich in zwei Mechanismen aufteilen, den klassischen oder auch kanonischen Weg (c-NHEJ) und den alternativen Weg (alt-NHEJ) (Abbildung 1-1). Die c-NHEJ zeichnet sich durch die direkte Ligation der Bruchenden aus, während alt-NHEJ Mikrohomologien nahe des DSBs zur Religation verwendet. Deshalb wird dieser Reparaturweg auch *microhomology-mediated end joining*, MMEJ, genannt.

c-NHEJ

Die kanonische NHEJ läuft in vier Schritten ab: (1) Erkennung der DNA-Bruchenden (2) Stabilisierung und *Tethering* der Enden, (3) Prozessierung der Bruchenden, und (4) Ligation des DSB (Abbildung 1-1 A). Im ersten Schritt wird der DSB von dem KU-Heterodimer bestehend aus KU70 und KU80 erkannt und sequenzunabhängig innerhalb weniger Sekunden gebunden (Mari *et al.*, 2006). Diese schnelle Bindung schützt die Bruchenden vor nukleolytischem Abbau. Weiterhin fungiert das KU-Heterodimer als Plattform für die Rekrutierung einer Vielzahl an weiteren NHEJ-Faktoren (Chang *et al.*, 2017). Ist

eine Prozessierung der Bruchenden notwendig, kommt es anschließend zur Interaktion mit der katalytischen Untereinheit einer DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs). Die Rekrutierung von DNA-PKcs vermittelt die synaptische Verbindung der beiden gebrochenen Enden und die Stabilisierung des Komplexes (Hammel *et al.*, 2010). So werden einerseits die beiden KU-Heterodimere an den jeweiligen Bruchenden zusammengehalten und andererseits weitere Faktoren phosphoryliert und damit aktiviert (Dobbs *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2014). Je nach DNA-Schaden werden unterschiedliche Enzyme benötigt, um kompatible Enden für die Ligation zu produzieren. Dazu zählt in Säugern auch die Endonuklease ARTEMIS, welche bei einer Endresektion von Überhängen nötig ist. Das KU-Heterodimer kann zudem Polymerasen der Pol X-Familie rekrutieren, welche die Bruchenden um wenige Nukleotide verlängern können (Bebenek *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2014). Auch KU selbst ist durch seine enzymatische Aktivität an der End-Prozessierung beteiligt (Roberts *et al.*, 2010; Strande *et al.*, 2012). Komplexe DSBs (mit Einzelstrangüberhängen, Basenoxidation oder abasischen Stellen) werden mit langsamer Kinetik repariert und hängen von der Aktivität der DNA-PKcs ab, während weniger komplexe DSBs keine DNA-PKcs-Bindung erfordern und nur über KU und den Ligationkomplex effizient ligiert werden können (Datta *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2012). Zur Ligation der Bruchenden wird durch das KU-Protein der Ligase 4-Komplex rekrutiert (Nick McElhinny *et al.*, 2000). Dieser Komplex umfasst die Komponenten LIG4, XRCC4 sowie *XRCC4-like factor* (XLF). Dabei wirkt XRCC4 als wichtiges Gerüstprotein und XLF stabilisiert die Interaktion mit den KU70-Proteinen (Hammel *et al.*, 2011; Pannunzio *et al.*, 2018). Der Komplex kann weiter durch PAXX stabilisiert werden, einem Paralog von XRCC4 und XLF, welches ebenfalls direkt an die KU-Heterodimere bindet (Ochi *et al.*, 2015). Durch diese Überbrückung und Verbindung der DNA-Enden kann der DSB mittels des Ligase 4-Komplexes ligiert werden und die genomische Integrität wird wiederhergestellt.

In Pflanzen konnten Homologe für die Hauptakteure in der c-NHEJ – KU70, KU80, LIG4 und XRCC4 – identifiziert werden. Für die weiteren Proteine wurden bisher keine Homologe nachgewiesen. Obwohl in *Arabidopsis* drei Gene gefunden wurden, die für ARTEMIS-ähnliche Proteine codieren, konnte diesen keine Rolle in der c-NHEJ nachgewiesen werden (Molinier *et al.*, 2004; Charbonnel *et al.*, 2010). Mutantenlinien der wichtigen c-NHEJ Komponenten weisen in *Arabidopsis* eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien auf, zeigen jedoch keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp (West *et al.*, 2000; Tamura *et al.*, 2002; West *et al.*, 2002).

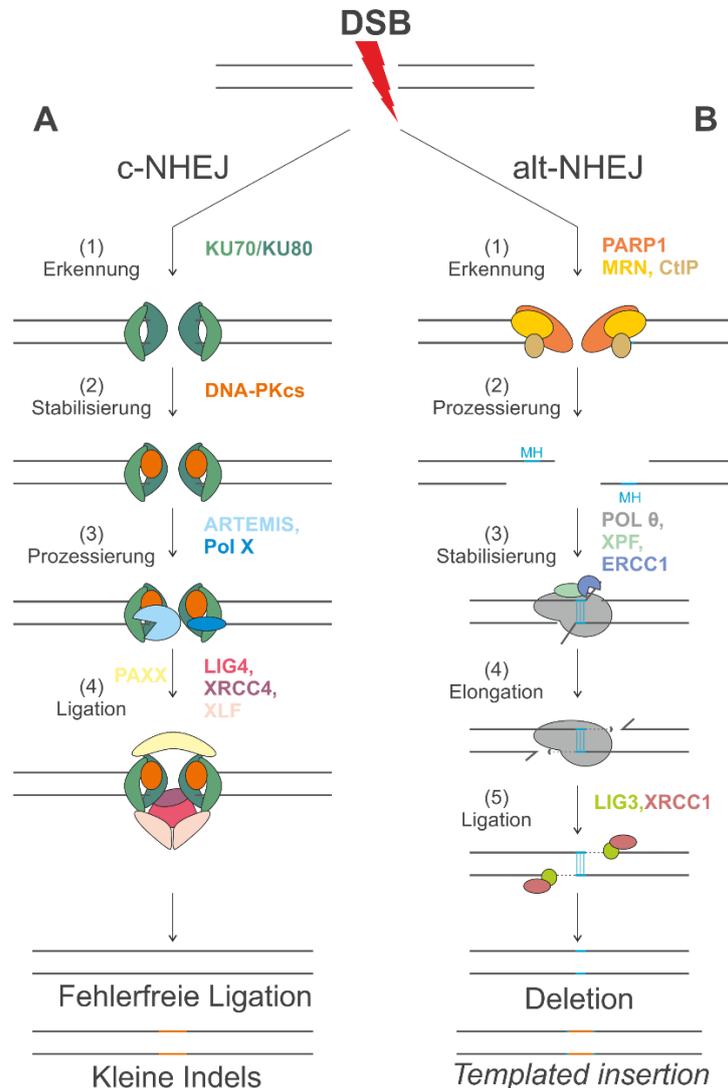


Abbildung 1-1: Reparatur eines DSB mittels der Nicht-homologen Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ).

Die NHEJ unterteilt sich in zwei Wege, den klassischen Weg (c-NHEJ, A) und den alternativen Weg (alt-NHEJ, B). **(A)** Nach Erkennung der Bruchenden durch das KU-Heterodimer werden diese durch die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase DNA-PKcs stabilisiert und weitere Faktoren werden rekrutiert. Wenn nötig, werden die Bruchenden prozessiert, sodass diese anschließend über den Ligase 4-Komplex ligiert werden können. Dieser Weg resultiert häufig in kleinen Insertionen oder Deletionen (Indels), die Bruchenden können aber auch fehlerfrei miteinander verknüpft werden. **(B)** Bei der alt-NHEJ wird der DSB von PARP1 erkannt. Anschließend werden die Bruchenden prozessiert und dabei Mikrohomologien (MH) freigelegt, die über die Pol θ verknüpft werden. Die dabei entstandenen Überhänge werden entfernt und die Lücken durch Pol θ aufgefüllt. Im letzten Schritt wird das DNA-Rückgrat über den Ligase 3-XRCC1-Komplex oder die Ligase 1 geschlossen. Hier geht der Bereich zwischen den MH verloren und es können durch den Pol θ -vermittelten Mechanismus der SD-MMEJ *templated insertions* entstehen.

Das KU-Heterodimer

Die kanonische NHEJ wird auch als KU-abhängiger Weg beschrieben, da hier das in allen Eukaryoten konservierte KU-Heterodimer eine Schlüsselrolle übernimmt. Dieser Komplex setzt sich aus einer 70 kDa und einer 80 kDa großen Untereinheit zusammen, weshalb diese Proteine entsprechend KU70 bzw. KU80 genannt werden. Beide KU-Proteine sind stark exprimierte Kernproteine und besitzen drei Domänen. Die zentrale Domäne fördert die Dimerisierung und die Bindung an die DNA. Es konnte gezeigt werden, dass das Heterodimer eine Ringstruktur ausbildet und sequenzunabhängig an DSB-Enden bindet (Walker *et al.*, 2001). Dabei findet die Bindung von KU70 proximal, die Bindung von KU80 distal zum DNA-Ende statt. Dadurch werden diese vor dem katalytischen Abbau geschützt sowie in räumlicher Nähe gehalten. Die N-terminale vWA-Domäne dient als Protein-Protein-Interaktionsplattform und ist damit essentiell für die Rekrutierung der weiteren Faktoren des c-NHEJ Reparaturweges. Die C-terminale Domäne unterscheidet beide KU-Proteine voneinander. In Säugern wird über diese Domäne von KU80 die DNA-PKcs rekrutiert (Singleton *et al.*, 1999), in *S. cerevisiae* und *A. thaliana* ist diese Domäne jedoch nicht vorhanden. Das KU-Heterodimer hat einen großen Einfluss auf die Auswahl des Reparaturweges nach einem DSB. KU ist stets eines der ersten Proteine am DSB, unabhängig von der Phase des Zellzyklus. Wenn die Enden kompatibel sind, versucht die Zelle den Bruch zuerst via c-NHEJ zu reparieren (Pierce *et al.*, 2001; Frank-Vaillant und Marcand, 2002). Sind die Bruchenden von zu KU antagonistischen Faktoren wie PARP1 oder MRE11 prozessiert worden, kann das Protein wegen seiner geringeren Affinität zu Einzelsträngen nicht binden.

KU ist ein vielseitiges, multifunktionales Protein, das nicht nur eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur, sondern auch bei der Telomer-Aufrechterhaltung und als Signalmolekül bei DNA-Schäden spielt (Übersicht in Fell und Schild-Poulter, 2015). So erfolgt die Unterdrückung weiterer Reparaturwege wie der HR wahrscheinlich nicht nur über die schnelle Bindung von DSB-Enden, sondern auch dadurch, dass das KU-Heterodimer die ATM-abhängige ATR Aktivierung verhindert (Tomimatsu *et al.*, 2007). Eine Rolle für KU bei der Aufrechterhaltung von Telomeren in Hefen wurde schon früh postuliert (Porter *et al.*, 1996; Gravel *et al.*, 1998). Auch in Säugern ist KU wichtig für die ordnungsgemäße bzw. korrekte Erhaltung der Telomerstruktur (Wang *et al.*, 2009).

In *Arabidopsis* wurden zu beiden Proteinen des KU-Heterodimers Homologe identifiziert, *At*KU70 und *At*KU80. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese beiden Proteine ebenfalls ein Heterodimer formen und an dsDNA, jedoch nicht an ssDNA binden (Tamura *et al.*, 2002; West *et al.*, 2002). Eine Bindung an telomerische DNA-Bereiche sowie eine Rolle in der Aufrechterhaltung in der Telomerlänge wurde postuliert. Dabei wird KU70 wie auch KU80 im Gegensatz zu ihren Homologen in Säugern eine

negative Regulation auf die Länge der Telomere zugeschrieben, da in beiden Mutanten signifikant verlängerte Telomere festgestellt wurden (Bundock *et al.*, 2002; Riha *et al.*, 2002; Gallego *et al.*, 2003).

alt-NHEJ

Durch das ubiquitäre Vorkommen und die schnelle Bindung von KU an DSBs, erfolgt die Reparatur eines DSB meist mittels c-NHEJ. Ist dieser Weg jedoch beeinträchtigt, können alternative Mechanismen zur Endverknüpfung herangezogen werden. Dieser KU-unabhängige Weg zur DSBR wird in der Literatur unter vielen verschiedenen Synonymen beschrieben. Dazu zählen *backup-NHEJ*, alternatives NHEJ/EJ oder auch *Pol theta-mediated EJ/TMEJ*. In dieser Arbeit wird der Begriff der alternativen NHEJ (alt-NHEJ) verwendet.

alt-NHEJ wird durch die Resektion der 3'-Enden des DSB initiiert, wodurch kurze Einzelstrang-Überhänge entstehen (Abbildung 1-1 B). Zunächst wird der Bruch über PARP1 erkannt (Audebert *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 2009). Dabei steht PARP1 in direkter Konkurrenz zu KU70/KU80 um die Bindung an die Bruchenden (Wang *et al.*, 2006). PARP1 ist neben der Erkennung des DSB auch für die anschließende Rekrutierung der weiteren Faktoren der alt-NHEJ wie CtIP und des MRN-Komplexes (MRE11, RAD50, NBS1) zur Endresektion und des Hauptakteurs POL θ notwendig (Mateos-Gomez *et al.*, 2015). Nach Bindung an einem DNA-Schaden findet eine Resektion über CtIP und den MRN-Komplex, dieselben Proteine, die die Resektion der Bruchenden in der HR vermitteln, statt. Bei der Prozessierung der Enden werden Mikrohomologien (MH) beidseitig des Schadens freigelegt, die zur Religation verwendet werden (Truong *et al.*, 2013). Für den Mechanismus der alt-NHEJ reichen MH zwischen 2 bp und 20 bp zur Hybridisierung der DNA-Stränge aus, während für die Reparatur mittels SSA und HR (Kapitel 1.1.1.2) eine weitere Resektion der Enden zur Freilegung größerer Homologien notwendig ist. Kommt es zu dieser erweiterten Prozessierung, wurde eine inhibierende Wirkung auf die alt-NHEJ festgestellt (Deng *et al.*, 2014). Die Paarung der MH dient der Stabilisierung der beiden Bruchenden, wobei der zugrundeliegende Mechanismus bisher nicht im Detail geklärt werden konnte (Zahn *et al.*, 2015; Seol *et al.*, 2018). Es wird allerdings angenommen, dass bei Säugern bereits in diesem Schritt die POL θ eine wichtige Rolle spielt (Black *et al.*, 2016). Anschließend können die überstehenden 3'-Überhänge durch Nukleasen wie XPF/ERCC1 entfernt werden (Ahmad *et al.*, 2008; Faridounnia *et al.*, 2018). Die so erzeugten 3'-Hydroxyl-Enden erlauben POL θ zu binden, die Elongation der DNA zu katalysieren und die Lücken aufzufüllen (Hogg *et al.*, 2012). Die Ligation der Enden wird im letzten Schritt durch den Xrcc1/Ligase 3-Komplex oder die Ligase 1 vorgenommen (Liang *et al.*, 2008; Masani *et al.*, 2016).

Als wichtigster Faktor für alt-NHEJ wurde die Polymerase Theta (POL θ , kodiert durch das *POLQ*-Gen) identifiziert (Yu und McVey, 2010; Koole *et al.*, 2014; Mateos-Gomez *et al.*, 2015; Kent *et al.*, 2015; Wood und Doublié, 2016). POL θ ist mit mehr als 250 kDa ein vergleichsweise großes Protein, das zusätzlich zu einer Polymerasedomäne am C-Terminus eine Helikasedomäne aufweist (Seki *et al.*, 2003; Black *et al.*, 2016; Malaby *et al.*, 2017). Auch kann POL θ über eine Transferase-Aktivität DNA-Stränge ohne Matrize elongieren. Indem so einzelne Nukleotide an das Bruchende hinzugefügt werden, können neue MH entstehen, die der alt-NHEJ dienen (Kent *et al.*, 2016). Des Weiteren konnte für POL θ eine Unterdrückung der HR durch die Bindung von RAD51 nachgewiesen werden (Ceccaldi *et al.*, 2015). Das Pflanzenhomolog zu POL θ heißt TEBICHI (TEB). TEB ist in Prozesse der DNA-Replikation, Rekombination und Genexpression, sowie in die DNA-Reparatur involviert (Inagaki *et al.*, 2006; Inagaki *et al.*, 2009; Klemm *et al.*, 2017). Neben der erhöhten Sensitivität von *Arabidopsis teb*-Mutanten gegenüber Genotoxinen, konnte für diese zwar die Aufnahme einer T-DNA in die Zelle, jedoch nicht deren Integration ins Genom beobachtet werden (van Kregten *et al.*, 2016). Damit wird TEB eine essentielle Rolle in der T-DNA Integration ins Pflanzengenom zugeschrieben. Auch für die anderen, in der alt-NHEJ involvierten Faktoren konnten in Pflanzen entsprechende Homologe gefunden, sowie diesen eine Funktion in der Reparatur zugeordnet werden (Babiychuk *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Gallego *et al.*, 2000; Charbonnel *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2013).

Die spezifischen MH-basierten Reparaturmuster der alt-NHEJ mit großen Deletionen und *templated insertions* lassen sich in Pflanzenzellen ebenso wie in Säugern beobachten (Qi *et al.*, 2013b; Shen *et al.*, 2017a). Die Bildung großer Deletionen lässt sich einfach durch den Verlust des Bereiches zwischen den zur Reparatur verwendeten MH nachvollziehen. Das Auftreten der Insertionen, die Sequenzhomologien zu umliegenden Bereichen aufweisen, ist hingegen nicht intuitiv nachzuvollziehen. Der Mechanismus, welcher zur Bildung dieser *templated insertions* führt, wird als *synthesis-dependent* MMEJ (SD-MMEJ) bezeichnet (Yu und McVey, 2010). Er gliedert sich in zwei Prozesse, *loop-out* und *snap-back*, die sich in der Orientierung der verwendeten MHs unterscheiden (Abbildung 1-2). Beim *loop-out* SD-MMEJ entstehen Reparaturprodukte mit direkten Sequenzwiederholungen, während beim *snap-back* Mechanismus nach der Reparatur invertierte Sequenzwiederholungen an der Bruchstelle vorzufinden sind. Diese sich wiederholenden Sequenzmotive haben ihren Ursprung in flankierenden Bereichen in der direkten Umgebung des DSB. Durch Entwindung oder Resektion des DNA-Stranges werden kurze direkte oder invertierte MH in der Nähe des DSB freigelegt. Diese kurzen *Primer Repeats* vermitteln die Bildung transienter Sekundärstrukturen. Beim *loop-out* SD-MMEJ werden zwei gleiche Paare von MH freigelegt, welche jeweils abwechselnd nacheinander angeordnet sind und den DSB umspannen (Abbildung 1-2 A).

1. Einleitung

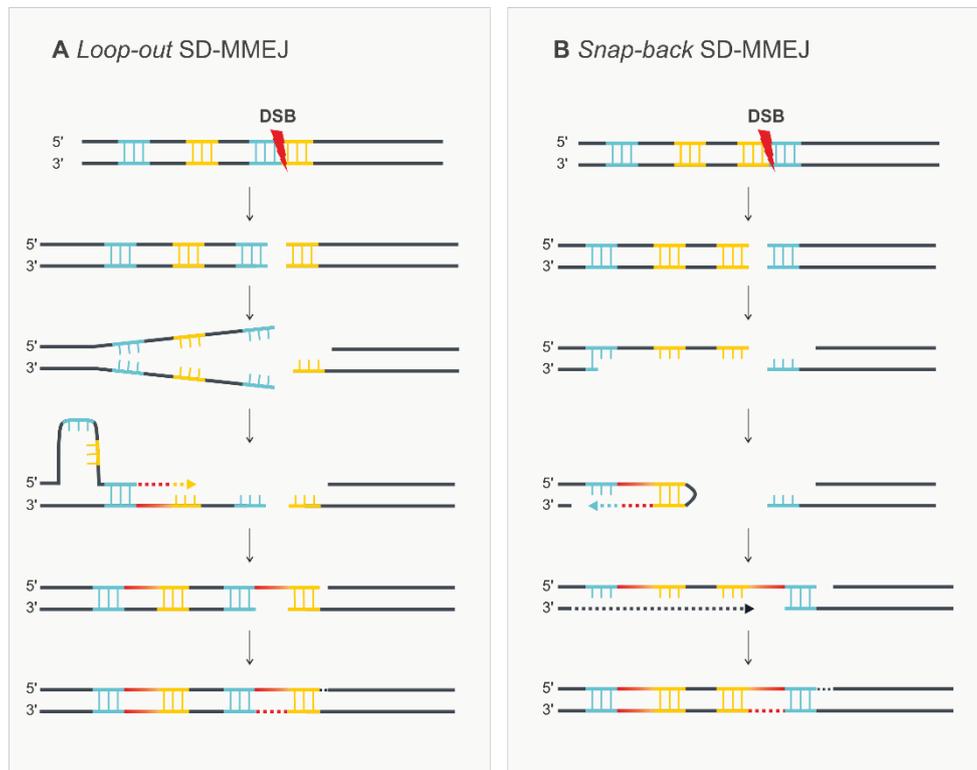


Abbildung 1-2: Mechanismen des *synthesis-dependent* MMEJ (SD-MMEJ).

Grundsätzlich sind zwei Mechanismen beschrieben, die sich in der Anordnung der verwendeten Mikrohomologien unterscheiden. **(A)** Beim *loop-out* SD-MMEJ sind die Sequenzwiederholungs-Paare (gelb bzw. hellblau) abwechselnd angeordnet und eines der Paare umspannt den DSB. Wird der Doppelstrang der DNA geöffnet, kann die nahe des Bruchs gelegene blaue Sequenz mit dem homologen Bereich paaren, wobei eine nach außen gewölbte Schleife (*Loop-out*) entsteht. Nach Verlängerung des DNA-Stranges kann sich die zweite Homologie (gelb) mit dem anderen Ende des DSB verknüpfen, wobei der neue synthetisierte Bereich (rot) zu einer Insertion an der Bruchstelle führt. **(B)** Liegen die Sequenzwiederholungen invertiert zueinander vor, kann sich nach Prozessierung der Bruchenden durch Umklappen des einzelsträngigen Überhangs eine *hairpin*-Struktur ausbilden. Auch hier wird ausgehend von der neu verbundenen Homologie über eine Polymerase die DNA-Synthese gestartet. Anschließend wird die *hairpin*-Struktur wieder aufgelöst und der verlängerte Strang kann mit dem gegenüberliegenden Bruchende paaren (*snap-back*). Die so an der Bruchstelle inserierte Sequenz (rot) liegt in umgekehrter Richtung zu ihrem Template vor.

Erfolgt nach dem Entwinden der DNA eine Anlagerung der DSB nahen MH an die von ihr proximal gelegene, komplementäre MH, entsteht eine einzelsträngige Auswölbung der DNA, die als *loop-out* Struktur bezeichnet wird. Beim *snap-back* SD-MMEJ sind zwei gleiche Paare von MH in unterschiedlicher Orientierung vorhanden (Abbildung 1-2 B). Nach Resektion können die invertierten, komplementären MH innerhalb des entstandenen 3'-Überhangs miteinander paaren und eine *hairpin*

Struktur ausbilden. Bei beiden Mechanismen wird ausgehend von der neu gepaarten MH die DNA-Synthese initiiert und die Sequenzinformation kopiert. Der so verlängerte Einzelstrang kann folgend dissoziieren und mit der MH am gegenüberliegenden Bruchende hybridisieren. Die folgende Auffüllung der Lücken wird durch Pol θ durchgeführt. Zusätzlich zu den beschriebenen einfachen *templated insertions* können auch komplexe Insertionen entstehen, die mehrere überlappende Kopien der benachbarten Sequenzen umfassen. Dieser Klasse der komplexen Insertion liegt ebenfalls eine Reparatur mittels SD-MMEJ zugrunde, die aus mehreren Syntheserunden und Dissoziationen von einer oder beiden Seiten des DSB resultieren (Yu und McVey, 2010).

1.1.1.2 Homologe Rekombination

Im Gegensatz zur Nicht-homologen Endverknüpfung tritt die Homologe Rekombination (HR) eher selten in somatischen Pflanzenzellen auf und ist hauptsächlich auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus beschränkt (Übersicht in Puchta, 2005). In meiotischem Gewebe hingegen ist die HR essentiell für die Paarung der Chromosomen, die Rekombination und den Austausch von genetischer Information. Grundsätzlich basiert HR immer auf der Beteiligung eines homologen Sequenzabschnittes, dessen intakte Sequenzinformation als Matrize zur Reparatur des DSB dient. Dabei lässt sich die HR jedoch in konservative und nicht-konservative HR unterteilen, abhängig davon, ob der reparierte DNA-Abschnitt die vollständige, ursprüngliche Sequenz enthält. Die HR umfasst mehrere unterschiedliche Mechanismen, die sich im Ablauf und durch die beteiligten Enzyme unterscheiden. Dazu zählen die beiden in somatischem Gewebe vorherrschenden Reparaturmechanismen, *single-strand annealing* (SSA) und *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA), sowie der *double-strand break repair* (DSBR)- und der Dissolutions-Weg, die beide in der Meiose eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 1-3).

Allen HR-Wegen gemeinsam ist die anfängliche 5'-zu-3'-Resektion, die durch den MRN-Komplex vermittelt wird. Dabei werden einzelsträngige 3'-Überhänge erzeugt, die durch die Anlagerung des heterotrimeren RPA-Komplexes (Replikationsprotein A) vor nukleolytischem Abbau geschützt sind (Eschbach und Kobbe, 2014). Sind beidseitig des Bruchs in diesen Überhängen Homologien von mehr als 20 bp vorhanden, kann der DSB mittels SSA repariert werden. Dieser Reparaturweg ähnelt mechanistisch der alt-NHEJ. Nach dem Freilegen der Homologien können diese miteinander hybridisieren und es entsteht ein chimäres dsDNA-Molekül. In Hefen scheint RAD52 beteiligt zu sein, da es nach der Endresektion an den einzelsträngigen DNA-Nukleoproteinkomplex rekrutiert wird (van Dyck *et al.*, 2001). Auch beim Menschen konnte eine Wechselwirkung von RAD52 mit RPA nachgewiesen werden (Ma *et al.*, 2017). Für die *Arabidopsis*-Homologe von RAD52 scheint es keine

1. Einleitung

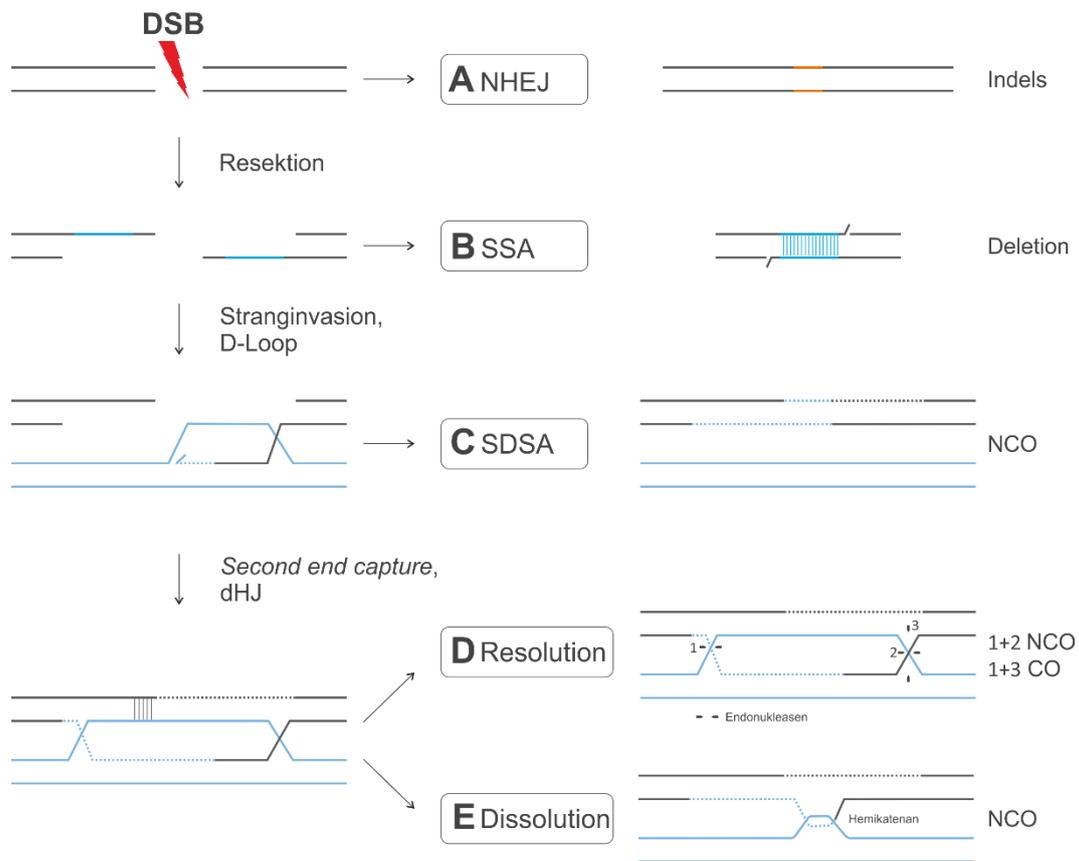


Abbildung 1-3: Übersicht über die Reparaturmechanismen nach einem DSB.

(A) Ist keine homologe Sequenz vorhanden, greift der fehleranfällige Mechanismus der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ), wobei die Bruchenden direkt miteinander ligiert werden. (B) Sind beidseitig des DSB homologe Bereiche (blau) zu finden kann der Bruch über *single strand annealing* (SSA) repariert werden. Hier entsteht ein Verlust von Sequenzen. (C-E) In der konservativen Homologen Rekombination (HR) zu der die drei Mechanismen des *synthesis dependent strand annealing* (SDSA), der Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) und der Dissolution gehören, kommt es zur fehlerfreien Reparatur des DSB. Nach Resektion der Bruchenden und Invasion des 3'-Überhangs in den homologen Bereich wird ein *Displacement-Loop* (D-Loop) ausgebildet. Die drei Mechanismen unterscheiden sich in der Auflösung des D-Loops. Im SDSA-Weg (C) wird der verlängerte invadierte DNA-Strang aus dem Donor-Molekül herausgelöst und kann Basenpaarungen mit dem komplementären Überhang des zweiten Bruchendes eingehen. Anschließend werden durch DNA-Synthese die Lücken geschlossen, es entsteht ein *non-crossover* Produkt (NCO). Durch die Neusynthese am invadierten Strang kann der D-Loop durch *second end capture* erweitert werden und es kann eine doppelte Holliday Junction (dHJ) ausgebildet werden. Diese Struktur kann entweder in der Dissolution (E) über *branch migration* mittels des RTR-Komplexes entwunden oder in der Resolution (D) durch strukturspezifische Endonukleasen aufgelöst werden. In der Dissolution entstehen immer NCO, während bei der DSBR je nach Schnittmuster auch *crossover* Produkte (CO) entstehen können.

Beteiligung an diesem Prozess zu geben (Samach *et al.*, 2011). Es wurde jedoch gezeigt, dass die RAD51-Paralogue XRCC1, RAD51B und RAD51D auch beim SSA eine Rolle spielen (Serra *et al.*, 2013). Nach Paarung der Einzelstränge werden deren überhängende Enden durch ein Dimer der Proteine RAD1 und RAD10 entfernt (Prado und Aguilera, 1995; Dubest *et al.*, 2002) und die Lücken mittels DNA-Synthese aufgefüllt. Zum Schluss wird das DNA-Rückgrat ligiert. Infolgedessen geht die Sequenzinformation zwischen den Homologien sowie einer der homologen Sequenzbereiche verloren, weshalb dieser Reparaturweg als einziger der nicht-konservativen HR zugeordnet wird (Übersicht in Knoll *et al.*, 2014a).

Sind keine repetitiven Homologien beidseitig des DSBs vorhanden, ist eine exogene Matrize zur Reparatur mittels der anderen Mechanismen der HR vonnöten. Hier kann zum Beispiel das Schwesterchromatid oder das homologe Chromosom verwendet werden (Kadyk und Hartwell, 1992; Palmer *et al.*, 2003). Die Suche nach dieser Vorlage wird durch RAD51 vermittelt. Dabei wird das den Einzelstrang ummantelnde RPA durch RAD51 ersetzt, der freie Einzelstrang kann in einen homologen Sequenzabschnitt invadieren und verdrängt dadurch einen Strang des doppelsträngigen Donormoleküls. Die so entstandene Struktur wird als *Displacement loop* (D-Loop) bezeichnet (Abbildung 1-3). Der Stranginvasion folgt eine Verlängerung des eingewanderten Einzelstranges, wobei der homologe Strang als Matrize dient. Im SDSA-Weg wird nach Ende der Neusynthese der D-Loop aufgelöst und damit der invadierte Einzelstrang freigesetzt. Dieser kann aufgrund der Verlängerung eine Paarung mit dem prozessierten, gegenüberliegenden Bruchende eingehen und durch Auffüllen der Lücken sowie der Ligation des DNA-Rückgrats wird der DSB repariert (Nassif *et al.*, 1994).

Wird der invadierte Strang jedoch stark weiterverlängert, kann es zur Hybridisierung zwischen dem verdrängten Strang des D-Loops und dem nun dazu komplementären Ende des zweiten Einzelstranges am Bruchende kommen, die auch als *second end capture* bezeichnet wird. Dieser Prozess wird durch RAD52 vermittelt (McIlwraith und West, 2008; Nimonkar *et al.*, 2009). Die anschließende Ligation der Bruchenden führt zur Ausbildung des DSBR-Intermediates einer doppelten Holliday-Junction (dHJ, Abbildung 1-3). Die Auflösung dieser dHJ-Struktur kann über die beiden HR-Reparaturwege der DSBR und der Dissolution stattfinden. Der vorherrschende Mechanismus, die Dissolution, wahrt dabei die Integrität des Genoms, da hier ausschließlich *non-crossover* (NCO)-Produkte entstehen und die beiden DNA-Moleküle somit ohne Austausch von Chromosomenbereichen getrennt werden. Dieser Prozess wird über den in Eukaryoten stark konservierten RTR-Komplex katalysiert (Bizard und Hickson, 2014; Knoll *et al.*, 2014b). Dieser besteht aus einer RECQ-Helikase, die die beiden Junctions der dHJ aufeinander zuführt, einer Typ 1 A Topoisomerase, die die daraus resultierende Superspiralisierung der DNA entspannt und die entstandene Hemicatenan-Struktur auflöst, sowie Strukturproteinen. In

Arabidopsis konnten als am RTR-Komplex beteiligte Proteine RECQ4A, TOP3 α und RMI1/RMI2 identifiziert werden (Hartung *et al.*, 2008; Bonnet *et al.*, 2013; Schröpfer *et al.*, 2014; Séguéla-Arnaud *et al.*, 2015; Röhrig *et al.*, 2018; Dorn *et al.*, 2018). Die Resolution der dHJ wird beim DSBR-Modell durch Struktur-spezifische Endonukleasen erreicht, die aufgrund ihrer Funktion auch als Resolvasen bezeichnet werden (Wyatt und West, 2014; Szostak *et al.*, 1983). Durch die Induktion symmetrischer Schnitte an den beiden Kreuzungspunkten der dHJ kommt es zur Trennung der beiden Doppelstränge. Hier können so, abhängig der Schnitttrichtung der Resolvasen, neben NCO- auch *crossover* (CO)-Produkte entstehen. Diese Resolutions-vermittelte HR lässt sich hauptsächlich während der Meiose beobachtet, und die CO-Produkte, die aus dem Chromosomenarmaustausch resultieren, sind für die Durchmischung des elterlichen Erbgutes erforderlich.

Puchta (1998) konnte zeigen, dass in somatischen Pflanzenzellen neben SSA nur SDSA effizient arbeitet. Bei einer effizienten Reparatur über DSBR würden somatische Zellen ihre Genomstabilität gefährden, da dieser Reparaturweg wie beschrieben für die CO-Induktion verantwortlich ist. Die Bildung von CO zwischen sich wiederholenden, ektopischen Sequenzen, die überall im Pflanzengenom zu finden sind, könnte zur Bildung von di- oder azentrischen Chromosomen führen. Aus diesem Grund tritt die DSBR hauptsächlich während der Meiose auf, wo die exakte Paarung homologer Chromosomen durch die Bildung des synaptonemalen Komplexes sichergestellt wird.

Durch die Verwendung transgener Rekombinationssubstrate mit unterschiedlichen Anordnungen der Homologien ist es möglich, die Rolle verschiedener Faktoren in diesen Reparaturwegen *in planta* zu charakterisieren. In diesen spezifischen HR-Reporterlinien kann durch die Expression einer Sequenz-spezifischen Nuklease ein DSB induziert werden, was zur Wiederherstellung eines Markers durch SSA oder SDSA führt (Orel *et al.*, 2003). In ersten Experimenten wurde I-SceI zur DSB-Induktion verwendet, um einen unterbrochenen ORF (*open reading frame*) eines GUS-Gens wiederherzustellen. Damit konnte in Tabak gezeigt werden, dass die Reparatur eines aus drei durch I-SceI induzierten DSBs durch SSA vermittelt wird, wenn die Bruchstelle von Homologien flankiert wird (Siebert und Puchta 1998). Im Gegensatz dazu zeigte der SDSA-Reparaturweg unter ähnlichen Bedingungen eine fünfmal geringere Effizienz im Vergleich zu SSA (Orel *et al.*, 2003). Zusätzlich konnte die Beteiligung der oben genannten Faktoren XRCC2, RAD51B und RAD51D sowie RAD1/RAD10 an SSA-Weg nachgewiesen werden (Dubest *et al.*, 2002; Serra *et al.*, 2013). Weitere Proteine, die in diesem Weg eine Funktion haben könnten, sind die Helikase FANCM und die Nuklease MUS81 (Mannuss *et al.*, 2010). Da nur eine geringfügige Beteiligung dieser festgestellt werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass weitere Nukleasen und Helikasen in der Lage sind, sich gegenseitig zu substituieren, was den Nachweis von Schlüsselfaktoren der SSA-vermittelten HR erschwert. MUS81 scheint auch an SDSA beteiligt zu sein, während Mutanten

von Proteinen, die für den Strangaustausch verantwortlich sind, nur einen Effekt bei der Reparatur der SDSA-Reporterlinie zeigen. Infolgedessen wurde in *Arabidopsis* eine wesentliche Rolle für XRCC3 und RAD54 zusätzlich zu RAD51 in SDSA postuliert (Roth *et al.*, 2012). Andere ATPasen wie RAD5A, welche eine Rolle bei der postreplikativen Reparatur spielt (Chen *et al.*, 2008), und FANCM, welche auch in der Kontrolle der meiotischen Rekombination involviert ist (Knoll *et al.*, 2012), sind ebenfalls an der SDSA-vermittelten Reparatur beteiligt (Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012).

1.1.2 Entstehung großer chromosomaler Veränderungen

Die zuvor beschriebenen Reparaturwege der DSBR tragen zur Integrität des Genoms eines Organismus bei, jedoch können im Rahmen der Reparatur entstandene Veränderungen auch die Variabilität erhöhen und die evolutionäre Entwicklung vorantragen. Neben einfachen Mutationen an der Bruchstelle kann es durch fehlerhafte Reparatur auch zu großen chromosomalen Umstrukturierungen (*chromosomal rearrangements*, CRs) kommen. Hierzu zählen die Ausbildung von Deletionen, Inversionen, Transpositionen, Duplikationen und Translokationen (Schmidt *et al.*, 2019b).

Obwohl große CRs eine wichtige Rolle in der menschlichen Entwicklung spielen, da sie zur genetischen Vielfalt und Evolution beitragen, werden sie in erster Linie im Kontext von verschiedenen genetischen Erkrankungen und Tumorbildung genannt (Abeyasinghe *et al.*, 2006; Thompson und Compton, 2011). In Pflanzen hängt das Auftreten von CRs ebenfalls mit Spezifikation und Genomevolution zusammen. Hier werden CRs im Vergleich zu Säugern jedoch im Allgemeinen mit ihrer Fähigkeit assoziiert, genetische Isolation zwischen Populationen und Arten zu erzeugen (White, 1978; Blanc *et al.*, 2000; Livingstone und Rieseberg, 2004; Kirkpatrick und Barton, 2006; Schubert und Vu, 2016). Je nach Art der strukturellen Veränderung können Gene unterbrochen, durch Fusionen neue *open reading frames* (ORFs) gebildet, die Genregulation verändert oder die genetische Information neu organisiert werden. So kann es unter anderem zur Entfernung chromosomaler Fragmente, zur Verschiebung von Centromeren, zur Unterdrückung der Rekombination oder zur Sterilität von Hybriden kommen (Allen *et al.*, 2004; Lowry und Willis, 2010; Rodríguez-Leal *et al.*, 2017; Schubert, 2018). Die Mehrheit der CRs sind zufällig über das gesamte Genom verteilt. Einige Umstrukturierungen treten jedoch wiederholt bei mehreren nicht verwandten Individuen mit einer Häufung von Bruchpunkten, einem gemeinsamen Umlagerungsintervall sowie einer gemeinsamen Größe in den gleichen Bereichen eines Chromosoms auf. Diese *rearrangement-hotspots* sind oftmals mit dem Auftreten repetitiver Sequenzen oder dem Vorhandensein von Heterochromatin-Euchromatin-Grenzen assoziiert (Lupski und Stankiewicz, 2005; Badaeva *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2016b; Zapata *et al.*, 2016).

Die Bildung der CRs wird über drei Reparaturmechanismen vermittelt: HR-basierte, NHEJ-basierte und DNA-Replikations-basierte Mechanismen (Gu *et al.*, 2008; Weckselblatt und Rudd, 2015; Abbildung 1-4). Dabei werden sich wiederholende CRs dem HR-basierten Mechanismus der NAHR (*non-allelic homologous recombination*) zugeordnet, während die NHEJ als Hauptmechanismus für viele der nicht-wiederkehrenden Umlagerungen verantwortlich sein kann (Lupski und Stankiewicz, 2005). Komplexe CRs werden den DNA-Replikation-basierten Mechanismen zugeschrieben. NAHR wird auch als ektopische Rekombination bezeichnet und war einer der ersten Mechanismen, der in Säugern mit für verschiedene Krankheitsbilder verantwortlichen genomischen Störungen in Zusammenhang gebracht wurde (Lupski, 1998). Durch Invasion des gebrochenen Stranges in einen homologen Bereich, der nicht dem allelischen Bereich auf dem Schwesterchromatid oder dem homologen Chromosom entspricht, können verschiedenste chromosomale Umlagerungen entstehen (Abbildung 1-4 A). Abhängig vom jeweiligen Lokalisationsort der Homologie kann der NAHR-Mechanismus zum Auftreten von Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Translokationen und Isochromosomen führen (Barbouti *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2016). Bei Untersuchungen der Rolle von CRs in der Evolution von *Triticeae* konnten *recombination hotspots* identifiziert werden und aufgrund der Sequenzumgebung könnten die dort wiederkehrenden Translokationen über den NAHR-Mechanismus hervorgerufen worden sein (Li *et al.*, 2016b). Auch die Replikations-basierten Mechanismen nutzen mittels *template switching* nach dem Halt einer Replikationsgabel Homologien in der genomischen Umgebung (Abbildung 1-4 B). Dabei kann es zur Invasion des gleichen Stranges in mehrere Homologieregionen kommen, wodurch die Verknüpfung oder Aneinanderreihung verschiedener Sequenzen von diskreten genomischen Positionen ermöglicht wird und so komplexe Umlagerungen entstehen (Zhang *et al.*, 2009). Die Invasion in verschiedene Regionen des Genoms durch einen einzelnen Strang ist nicht immer mit einer fehlerhaften Replikation assoziiert, sondern kann auch durch einen einfachen DSB induziert werden. Bei dieser als Multi-Invasion (MI) bezeichneten Umlagerung dringt ein DNA-Bruchende mit zwei hintereinandergelegenen Homologiebereichen gleichzeitig in zwei unabhängige intakte Donormoleküle ein, und die anschließende Auflösung dieses Intermediats kann zu einem Translokationsereignis führen (Piazza *et al.*, 2017). Kommt es zur Induktion von mehr als einem DSB gleichzeitig, können CRs durch NHEJ-basierte Reparatur entstehen (Abbildung 1-4 C). Liegen zwei DSBs auf demselben Chromosom, kann das dazwischenliegende Fragment deletiert oder invertiert werden, während das simultane Auftreten von zwei DSBs auf verschiedenen Chromosomen zu Translokationen, rekombinanten Chromosomen oder Chromosomenfusionen führen kann. Hier können potentiell sowohl die c-NHEJ als auch alt-NHEJ zur Entstehung beitragen (Lupski und Stankiewicz, 2005). Da diesen Umstrukturierungen keine Homologien zugrunde liegen und zufällig

zwei nicht zusammengehörige DSB-Enden miteinander verknüpft werden können, ist das Nachvollziehen der Bildung dieser CRs schwierig und die Rolle bei der Bildung natürlicher Umstrukturierungen des Genoms nicht genau geklärt.

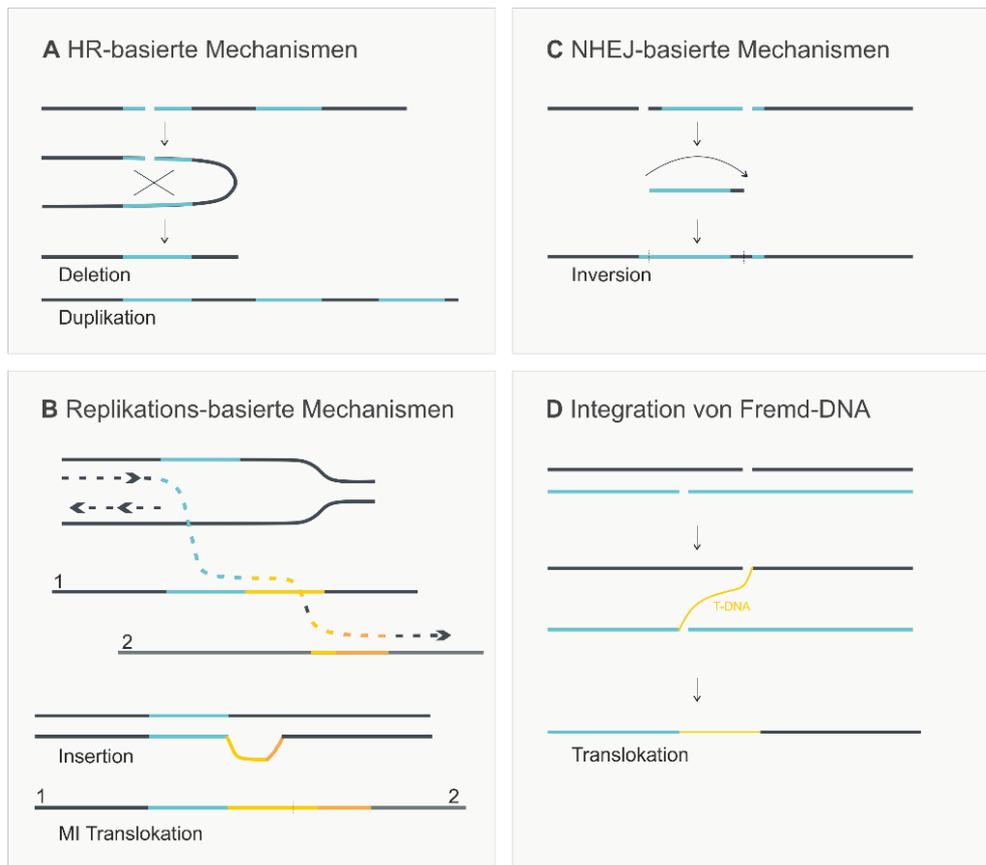


Abbildung 1-4: Verschiedene Mechanismen zur Bildung von chromosomalen Umlagerungen.

(A) Kommt es zu einem DSB in einer repetitiven Umgebung, kann die Reparatur mittels *non-allelic homologous recombination* (NAHR) stattfinden. Dieser HR-basierte Mechanismus nutzt homologe Bereiche meist in unmittelbarer Nähe auf demselben Chromosom und durch Rekombination können hierbei verschiedenste Umlagerungen wie Deletionen oder Duplikationen entstehen. (B) Ist die Replikation durch einen DSB blockiert, kann ein Strang in einen oder mehrere andere Bereiche mit Homologien eindringen und diese als Vorlage zur Elongation verwenden (*multi invasion*, MI). So können sich komplexe Umlagerungen wie die Insertion von Sequenzen verschiedener Bereiche oder Translokationen zwischen den verwendeten Templates bilden (C) Bei Auftreten von mehr als einem DSB können durch die NHEJ-basierten Mechanismen unabhängige Bruchenden miteinander ligiert werden. Treten zwei DSBs auf einem Chromosom auf, kann durch diese illegitime Verknüpfung zweier Bruchenden der zwischenliegende Sequenzbereich invertiert integriert werden. (D) Auch durch den Einbau von Fremd-DNA kann es zu CRs kommen. Integrieren beispielsweise beide Enden einer T-DNA in unterschiedliche DSBs auf zwei verschiedenen Chromosomen können diese verknüpft werden und eine Translokation entsteht.

CRs sind nicht nur auf eine fehlerbehaftete Reparaturmaschinerie zurückzuführen, sondern können auch durch bewegliche Elemente wie Transposons oder der Integration von Fremd-DNA entstehen (Abbildung 1-4 D). Sind mehrere DSBs gleichzeitig im Genom vorhanden, ist es möglich, dass beim Einbau eines fremden DNA-Moleküls die beiden Enden in verschiedene Brüche integrieren. So können in Pflanzenzellen bei dem sogenannten Mechanismus der heterogenen T-DNA Integration Deletionen oder Translokationen entstehen, je nachdem ob die DSBs auf einem oder verschiedenen Chromosomen liegen (Clark und Krysan, 2010; Hu *et al.*, 2017). Der Zusammenhang von genomischer Instabilität und transposablen Elementen (TEs) wurde schon in den 50er-Jahren von Barbara McClintock hergestellt (McClintock, 1953). Neben der HR-vermittelten Rekombination zwischen den verschiedenen, über das gesamte Genom verteilten Kopien von TEs, können CRs auch mittels einem Mechanismus der alternativen Transposition induziert werden (Gray, 2000).

Alle hier beschriebenen Mechanismen können chromosomale Umlagerungen verschiedenster Arten erzeugen, darunter Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen. Durch CRs kommt es oftmals zur Reorganisation des Genoms und damit zur Erhöhung der genetischen Vielfalt.

1.2 Gezielte Veränderung der DNA

Für die „Grüne Biotechnologie“ ist es wünschenswert, nicht nur durch ungerichtete Mutagenese mit Strahlung oder Chemikalien, sondern auch gezielt Veränderungen in der DNA einzufügen. Durch die Sequenz-spezifische Induktion von DSBs im Genom wird die Reparaturmaschinerie des Organismus rekrutiert. Mittels des fehleranfälligen Mechanismus des NHEJ können über das Einfügen von Mutationen zielgerichtet Gene ausgeschaltet werden oder mittels HR genaue Veränderungen an bestimmten Genen vorgenommen werden.

In ersten Experimenten wurden selten schneidende Endonukleasen als Werkzeuge verwendet. Unter anderem kam hier in Pflanzen I-SceI für die Induktion von DSBs zum Einsatz, eine Meganuklease aus *Saccharomyces cerevisiae* (Jacquier und Dujon, 1985; Perrin *et al.*, 1993). Da die Erkennungssequenz eine Länge von 18 nt hat, ist sie oftmals nicht im Genom des Zielorganismus vorhanden. Somit wird zwar nur an dieser Sequenz geschnitten und keine *off-target* Effekte erzeugt, die Erkennungssequenz muss aber dennoch zuerst in das Genom eingefügt werden. Dennoch wurde I-SceI in Pflanzen zur gerichteten Mutagenese sowie für die Untersuchung von grundlegenden Mechanismen in der DNA-Reparatur erfolgreich eingesetzt (Puchta *et al.*, 1996; Salomon und Puchta, 1998).

Mit der Einführung synthetischer Nukleasen wurde die gezielte Veränderung der DNA auf ein nächstes Level gebracht. Die Fusion von unspezifischen Nukleasedomänen an variable DNA-bindende Faktoren

bildet ein System, bei dem Schnitte in jeder beliebigen Sequenz im Genom eingeführt werden können. Als Nukleasedomäne wurde hier zumeist das TypIIIS Restriktionsenzym *FokI* verwendet, das im Dimer nukleolytisch aktiv ist und den gewünschten DSB einführt. Zuerst wurden die Zinkfingerdomänen aus Transkriptionsfaktoren als Bindedomäne einer Sequenz-spezifischen Nuklease adaptiert (Kim *et al.*, 1996). Ein Zinkfinger kann spezifisch drei Nukleotide erkennen. Damit kann eine Zinkfinger-Nuklease (ZFN), die aus zwei Monomeren mit jeweils drei bis sechs Zinkfingern und einer *FokI*-Domäne besteht, eine Sequenz von bis zu 36 nt spezifisch binden und in ihrer Mitte schneiden (Smith *et al.*, 2000; Sander *et al.*, 2011). Dieser modulare Aufbau ist im Gegensatz zu den Meganukleasen sehr vorteilhaft, da die ZFNs sich so spezifisch für die Erkennung der Zielsequenz bioinformatisch entwerfen lassen (Segal *et al.*, 2003; Maeder *et al.*, 2008; Maeder *et al.*, 2009). Jedoch kann die Spezifität der ZFN in Organismen mit großen Genomen verringert sein (Cornu *et al.*, 2008) und wird zusätzlich durch die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Zinkfingern beeinflusst, sodass es zu unvorhersehbaren Bindungen kommen kann. Des Weiteren wurden auch zytotoxische Effekte beobachtet (Szczeppek *et al.*, 2007; Cornu und Cathomen, 2010). Daher sind nicht nur die Klonierung dieser Nuklease, sondern auch die aufwendigen Tests auf Aktivität und Sequenz-Spezifität sehr zeitaufwendig (Isalan *et al.*, 1997; Hurt *et al.*, 2003).

Mit der Entdeckung und Entschlüsselung der TALEs (*transcription activator-like effectors*) (Bonas *et al.*, 1989; Boch *et al.*, 2009) wurde ein weiterer Faktor gefunden, der für eine spezifische Bindung an jeder Stelle im Genom anpassbar ist. Die DNA-Bindedomäne dieser Faktoren besteht aus mehreren konservierten Sequenzwiederholungen, bei denen die Positionen 12 und 13 variabel sind (*repeat-variable diresidue*, RVD) und die Bindung an eine der vier DNA-Basen vermitteln. Auch hier wurden die Effektoren an die *FokI* Nukleasedomäne fusioniert. Nach spezifischer Bindung beider Arme an die DNA über die RVD und anschließender Dimerisierung der *FokI* Domänen erfolgt die Induktion des DSB.

Beide Nukleasen, ZFNs wie TALENs, konnten zur gezielten Veränderung der DNA in Pflanzen bereits erfolgreich eingesetzt werden (Überblick in Voytas, 2013). Jedoch ist die Klonierung beider Systeme zeitaufwendig und die Anwendung nicht immer effizient und in allen Organismen möglich.

Mit der Adaption des CRISPR/Cas-Systems (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated*) für die Anwendung in der Gentechnologie wurde eine kostengünstige, einfache und effiziente Methode für den Laboralltag entwickelt, die als Revolution auf dem Gebiet der synthetischen Nukleasen angesehen wird.

1.2.1 Das natürliche CRISPR/Cas-System

Ursprünglich stammt das CRISPR/Cas-System aus Prokaryoten, wo es als adaptives Immunsystem zur Verteidigung gegen invasive Fremd-DNA dient. Diese läuft in drei Phasen ab: Adaption, Expression/Prozessierung/*cr*RNA Reifung und Interferenz (Abbildung 1-5, Barrangou *et al.*, 2007). In der ersten Phase der Adaption wird eingedrungene Fremd-DNA erkannt, geschnitten und in den CRISPR-Array integriert um einen „Erinnerungsspeicher“ über die Infektion zur Verfügung zu stellen. Die ausgeschnittene DNA wird als *Protospacer* bezeichnet, während die als *Repeat* im CRISPR-Array integrierte DNA *Spacer* genannt wird. Der „Erinnerungsspeicher“ wird in der nächsten Phase der

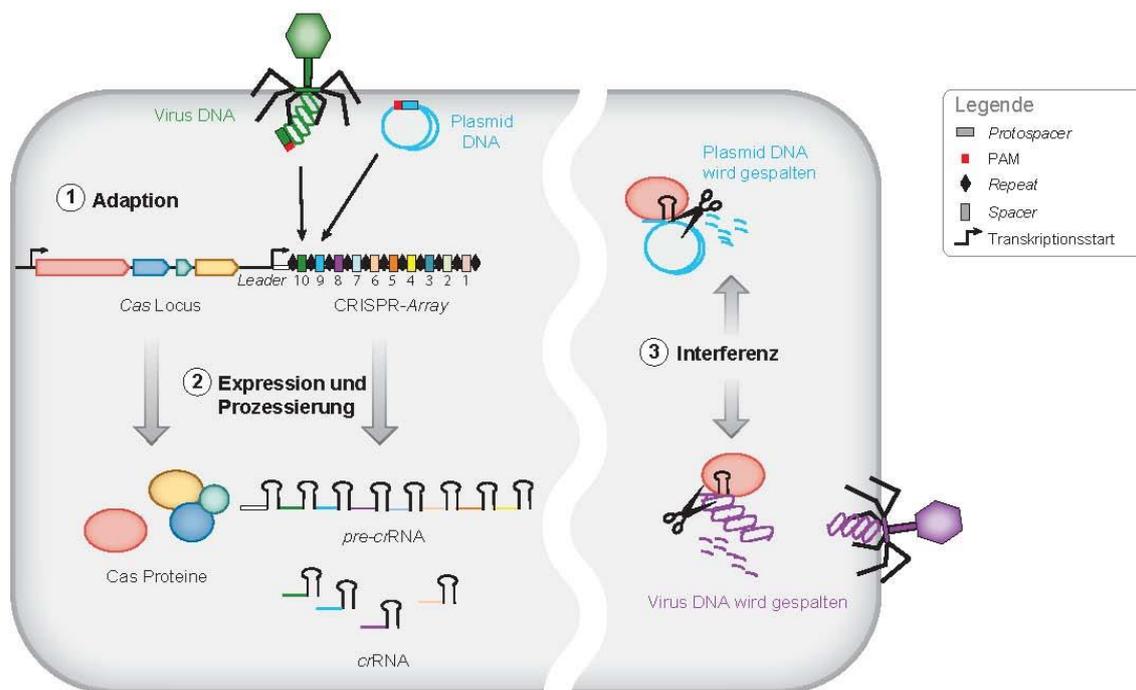


Abbildung 1-5: Das natürliche CRISPR/Cas-System als adaptives Immunsystem.

In Bakterien und Archaeen dient das CRISPR/Cas-System dem Schutz vor Infektion mit Fremd-DNA. Zunächst wird in der ersten Phase der Adaption die eindringende Fremd-DNA geschnitten und in den CRISPR-Array als *Spacer* eingebaut. Anschließend wird der *Cas* Locus sowie der CRISPR-Array exprimiert und die entstandene *pre-cr*RNA zur reifen *cr*RNA prozessiert. Im dritten Schritt der Interferenz wird die Immunität gegenüber einer erneuten Infektion mittels der *Cas* Proteine zusammen mit der *cr*RNA vermittelt. Dabei kann der RNA-Protein-Komplex an die zur *cr*RNA komplementären Sequenzen der eingedrungenen DNA binden und diese wird geschnitten. Zur Unterscheidung zwischen Fremd-DNA und wirtseigener DNA dient das PAM-Motiv (rot). (Abbildung verändert nach Barrangou *et al.*, 2007).

Expression und Prozessierung abgerufen. Dazu wird der gesamte CRISPR-*Array* abgelesen und es entsteht ein langes Transkript, die sogenannte *pre-crRNA*. Diese *pre-crRNA* wird im nächsten Schritt weiter prozessiert zu den „reifen“ *crRNAs*, welche jeweils einen *Spacer*, der komplementär zur Zielsequenz ist, und die CRISPR-Sequenz beinhalten. Diese formen mit weiteren Cas-Effektorproteinen und der *tracrRNA* einen RNA-Protein-Komplex. Bei einer anschließenden Infektion wird in der letzten Phase diese Interferenzmaschinerie durch *crRNAs* gesteuert, um die zum *Spacer* komplementären Sequenzen, sogenannte *Protospacer*, in den fremden Nukleinsäuren zu binden und anschließend zu spalten. Für eine Unterscheidung zwischen eigener und fremder DNA, ist neben der eigentlichen Zielsequenz noch eine kurze benachbarte Sequenz, das *Protospacer adjacent motif* (PAM) für die Erkennung und Bruchinduktion notwendig.

Das Auftreten der CRISPR-*Arrays* wurde in Bakterien zum ersten Mal in den 1980ern beschrieben (Ishino *et al.*, 1987). Erst viel später konnte ein Zusammenhang zwischen diesen und der Immunantwort auf eindringende Phagen oder Plasmid-DNA in Bakterien und Archaeen hergestellt werden (Bolotin *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006). 2012 wurde schließlich das Potential dieses natürlichen Systems erkannt und eine biotechnologische Anwendung zur gezielten Genommanipulation geschaffen (Jinek *et al.*, 2012).

CRISPR/Cas-Systeme sind stark divers, wobei die derzeitige Klassifizierung entsprechend der Zusammenstellung der *Cas*-Gene sowie der Art des Interferenz-Komplexes zwei Klassen, sechs Typen und einige weitere Untertypen unterscheidet (Koonin *et al.*, 2017; Makarova *et al.*, 2018; Shmakov *et al.*, 2017). In Klasse 1 (einschließlich Typ I, III und IV) sind die CRISPR/Cas-Systeme mit multi-Cas Proteinkomplexen zur Interferenz zusammengefasst, während in Klasse 2 (darunter Typ II, V und VI) die Interferenz durch ein einzelnes großes Effektorprotein mit mehreren Domänen erreicht wird. Die weitere Einteilung der Klassen in die verschiedenen Typen erfolgt anhand der Effektorproteine. In der Biotechnologie wurden bisher einige Systeme der Klasse 2 zur gezielten Induktion von Genomveränderungen angewendet, darunter verschiedene Cas9- (Typ II), Cas12- (Typ V) sowie Cas13-Proteine des Typs VI (Abbildung 1-6, Übersicht in Kumlehn *et al.*, 2018).

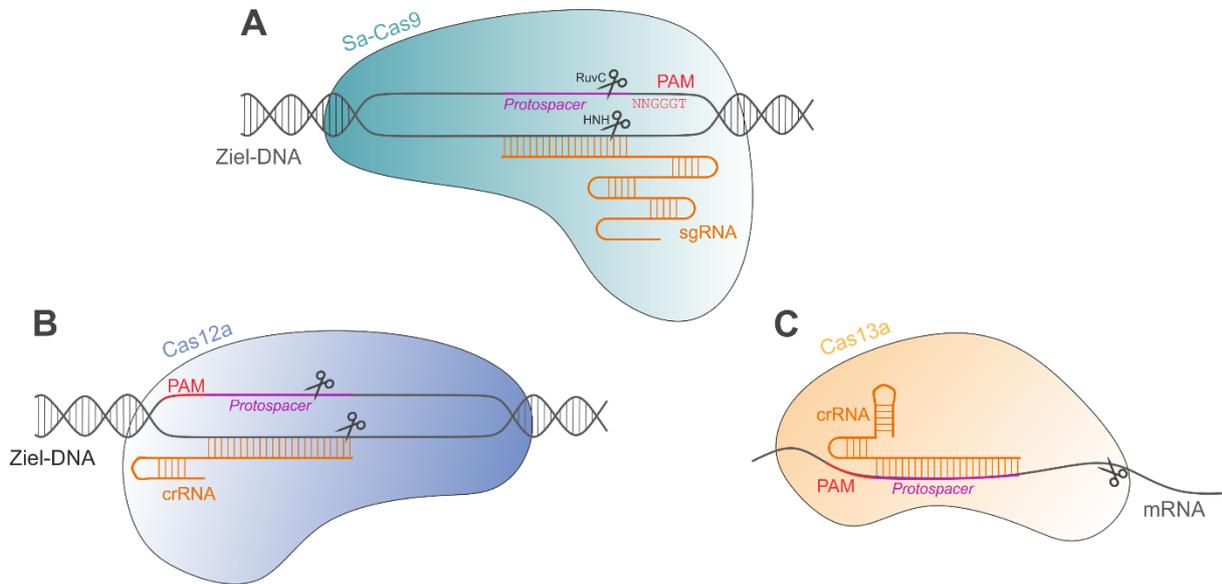


Abbildung 1-6: Verschiedene Cas-Typen der Klasse 2 der verschiedenen CRISPR/Cas-Systeme.

Das Cas9-Protein (A) sowie Cas12a (B) können zielgerichtet DNA binden und schneiden. Dabei wird die Bindung an den *Protospacer* (pink) über die *sgRNA* bzw. *crRNA* (orange) vermittelt. Cas9 induziert den DSB 3 bp upstream des PAM (*Protospacer adjacent motive*, rot), welches beispielsweise für *S. aureus* Cas9 5' -NNGGGT-3' lautet. Cas12a schneidet hingegen distal zum PAM und induziert Brüche mit Überhängen. (C) Proteine des Typ VI wie Cas13a können RNA binden und vermitteln deren Degradation.

1.2.2 CRISPR/Cas als biotechnologisches Werkzeug

Die Anwendung des CRISPR/Cas-Systems in der Biotechnologie wurde durch die Arbeitsgruppen um Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier ermöglicht (Jinek *et al.*, 2012). Durch eingehende biochemische Charakterisierung des Typ II-Systems in *Streptococcus pyogenes* und die anschließende Modifizierung zur Vereinfachung des Einsatzes als programmierbare Nuklease wurde ein einfaches und effizientes Werkzeug zur gezielten Bruchinduktion geschaffen. Das Cas9-Protein besitzt zwei Nuklease-Domänen, RuvC und HNH, welche je einen Strang der DNA schneiden und somit einen glatten DSB 3 bp *upstream* des PAM erzeugen. Die PAM-Sequenz in diesem Organismus lautet NGG, wobei auch die Sequenz NAG mit einer geringeren Effizienz erkannt wird. Mit Fusion von *crRNA* mit *tracrRNA* über einen kurzen *Linker* zur sogenannten *single guide RNA* (*sgRNA*) wurde die Komplexität des Systems von drei auf zwei Komponenten reduziert. Die Anpassung der 20 Nukleotide des *Spacers* auf der *crRNA*, die für die DNA-Erkennung notwendig sind, erlaubt eine programmierbare, sequenzspezifische DSB-Induktion an quasi jeder Stelle im Genom bei gleichzeitiger Expression der *sgRNA* mit der Cas-Nuklease.

Nach erfolgreicher Anwendung in humaner Zellkultur (Mali *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013) konnte innerhalb kürzester Zeit die Funktionalität des CRISPR/Cas-Systems in verschiedensten Modellorganismen gezeigt werden (DiCarlo *et al.*, 2013; Dickinson *et al.*, 2013; Gratz *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013a). Auch in Pflanzen wurde das System erfolgreich eingesetzt (Jiang *et al.*, 2013b; Li *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013b), wobei kurz darauf auch die stabile Vererbung induzierter Mutationen gezeigt werden konnte (Feng *et al.*, 2013; Fauser *et al.*, 2014). Bedingt durch die einfache Anwendung sowie die hohe Effizienz des Systems, war dieser Erfolg vorprogrammiert.

Um das CRISPR/Cas9-System noch zu erweitern, wurden in anderen bakteriellen Organismen weitere orthologe Cas9-Proteine identifiziert. Diese unterscheiden sich in ihrer Größe, der zugehörigen sgRNA, der Erkennungssequenz des PAMs sowie der Schnitteffizienz. Durch Experimente in menschlichen Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Orthologe aus *Staphylococcus aureus* (*SaCas9*, Abbildung 1-6 A), *Streptococcus thermophilus* (*Sth1Cas9*) und *Neisseria meningitidis* (*NmCas9*) eine ähnliche Schnitteffizienz wie das Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* (*SpCas9*) aufweisen, jedoch durch ihre geringere Größe einen Vorteil bei der Klonierung und Transformation des Expressionsvektors haben (Esvelt *et al.*, 2013). Diese Cas9-Orthologe wurden auch in Pflanzen getestet (Steinert *et al.*, 2015). Hier wurde für *SaCas9* mit dem PAM NGGGT im Vergleich zu den anderen Orthologen eine stark erhöhte Effizienz der Bruchinduktion von etwa 80 % gezeigt, wobei die Induktion vererbbarer Mutationen in einzelnen Linien fast 100 % erreichte. Dadurch dass die verschiedenen Cas9-Orthologe nur spezifisch mit ihrer System-eigenen sgRNA an die Zielsequenz binden können, ist der Einsatz unterschiedlicher Orthologe mit verschiedenen Funktionen in einer Zelle kombinierbar (Steinert *et al.*, 2017). Um dasselbe Cas9 zur gleichen Zeit an verschiedene Sequenzen im Genom zu führen, müssen mehrere sgRNAs gleichzeitig exprimiert werden. Dies ist durch das sogenannte Multiplexing möglich. Hier gibt es zwei Herangehensweisen. Zum einen kann jede sgRNA mit einem individuellen Pol III-Promotor exprimiert werden, zum anderen ist ein einzelner Promotor kombiniert mit einer anschließenden Prozessierung der RNA einsetzbar. Die zweite Möglichkeit ist für besonders viele sgRNAs geeignet, da ein Konstrukt mit eigenem Promotor für jede sgRNA zu groß werden würde.

Jedoch kann das CRISPR/Cas-System neben der DSB-Induktion auf weitere, vielfältige Weise eingesetzt werden. Durch Einführen von Punktmutationen in einer der Nuklease-Domänen des Cas9 entsteht eine Nickase (in *Arabidopsis* Cas9-D10A oder -H840A), durch Ausschalten beider Nuklease-Domänen ein sequenz-spezifisches DNA-Bindeprotein (*dead Cas9*, dCas9). Durch die Fusion des dCas9 mit anderen funktionellen Proteinen können an gewünschte Stelle im Genom Effektoren herangeführt werden (Übersicht in Schindele *et al.*, 2018). So ist unter anderem die transkriptionelle Kontrolle durch Repression oder Aktivierung, die Induktion von epigenetischen Veränderungen, Baseneditierung oder

die Bildung durch fluoreszente Proteine möglich. Mit dem Einsatz von der Nickase in Kombination mit zwei sgRNAs können in räumlicher Nähe zwei SSB gleichzeitig eingeführt werden. So kann ein DSB mit Einzelstrangüberhängen induziert werden. Zusätzlich erhöht die Verdoppelung der Erkennungssequenz zur DSB-Induktion die Spezifität und *off-target* Effekte werden verringert (Mali *et al.*, 2013).

Die gezielte Induktion von Mutagenese-Ereignissen ist inzwischen ein Standardverfahren. Sie wird hauptsächlich genutzt, um in der Grundlagenforschung die Funktion bestimmter Gene zu erforschen, aber auch um z.B. Nutzpflanzen zu verbessern.

1.3 Einsatz des CRISPR/Cas-Systems in der Pflanzenzüchtung: Von *Gene Editing* bis *Genome Engineering*

Schon seit Jahrtausenden betreibt die Menschheit Ackerbau. Um die angebauten Sorten immer weiter in Ertrag und Qualität zu steigern, wurden die heutigen Kulturpflanzen in jahrzehntelangen Bemühungen gezüchtet. Neue Eigenschaften, die aus spontanen Mutationen oder Rekombination entstanden, wurden ausgewählt und diese aus Auslesezüchtung, später Kreuzungszüchtung, entstandenen, verbesserten Sorten wurden erfolgreich etabliert. Insgesamt wurde jedoch der Genpool der gezüchteten Sorten aufgrund der exzessiven Selektion und genetischen Engpässen während der Domestizierung verkleinert. Dabei gingen auch viele Eigenschaften der ursprünglichen Pflanzen verloren, wodurch gerade moderne Nutzpflanzen viel stressanfälliger im Vergleich zu ihren wilden Verwandten sind (Shi und Lai, 2015).

Auch gerade heute wird es angesichts der prognostizierten Auswirkungen des Klimawandels und des Bevölkerungswachstums immer wichtiger, neue Pflanzen für eine nachhaltige landwirtschaftliche Produktion zu züchten. Deshalb ist die Erzeugung genetischer Variationen ein wesentlicher Schritt. Doch aufgrund des Mangels an dieser genetischen Variation für Merkmale von Interesse innerhalb des domestizierten Genpools, stoßen Züchter an ihre Grenzen. Um diese Probleme anzugehen und neue genetische Varianten zu erzeugen, die bessere Ernteerträge oder Anpassungsfähigkeit besitzen, haben Pflanzenzüchter verschiedene Strategien zur Erhöhung der Diversität entwickelt, darunter auch die Mutagenesezüchtung. Durch Induktion mit UV-Strahlung, Röntgen- und Gammastrahlung sowie Chemikalien wie EMS, wird die Mutationsrate über das natürliche Level hinaus erhöht. Diese künstliche Erhöhung der Variabilität durch ungerichtete Mutagenese kann jedoch zu unkontrollierbaren und unvorhersehbaren Veränderungen im Genom führen, die durch langwieriges Screening und Selektion wieder ausgekreuzt werden müssen. Auch die Einkreuzung von nützlichen

Merkmale aus wilden Arten wird durch den sogenannten *linkage drag*, der Übertragung von schädlichen Eigenschaften gemeinsam mit dem gewünschten Merkmal durch genetische Kopplung, beeinträchtigt. Dies erfordert ebenfalls häufig mehrere Runden der Rückkreuzung und Selektion, um den Elite-Hintergrund wiederherzustellen, was sehr zeit- und kostenintensiv ist. Daher ist aufgrund der Zufälligkeit der ungerichteten Mutagenese und der Rekombination die weitere Verbesserung der aktuellen Elite-Sorten ein langwieriger und aufwendiger Prozess (Lidder und Sonnino, 2012).

Mithilfe synthetischer Nukleasen wie dem CRISPR/Cas-System ist es möglich, durch die präzise Art dieser Geneditierungstechnologie diesen Prozess gezielt zu steuern. Die Anwendung dieser Technologien beruht auf dem Wissen um die Sequenzfolge im Genom für ortsspezifische Induktion der Veränderung sowie um die den wünschenswerten Eigenschaften zugrunde liegenden Loci und deren Verknüpfung miteinander. Der erste Schritt ist daher die funktionelle Charakterisierung möglicher Zielgene. Durch die zunehmende Identifikation verschiedener Gene, die den sogenannten QTL (*quantitative trait loci*) zugrunde liegen (Nogué *et al.*, 2016), sowie der wachsenden Anzahl an verfügbaren Referenzgenomen von Nutzpflanzen, kann das Potential der auf CRISPR-basierenden Züchtungsansätze immer besser ausgeschöpft werden.

1.3.1 Gene Editing

Zur Verbesserung von Nutzpflanzen wird das CRISPR/Cas-System bisher hauptsächlich zur Veränderung einzelner Gene angewendet (Zhang *et al.*, 2018; Hua *et al.*, 2019). Durch das Auslösen der natürlichen Reparaturmechanismen ist es möglich, subtile Veränderungen in Pflanzengenome einzubringen. Ein gezieltes Ausschalten bestimmter Gene kann durch die Induktion eines einzelnen DSB in einem Gen und die damit verbundene Mutagenese über den fehleranfälligen Mechanismus des NHEJ erreicht werden. Werden mithilfe eines Multiplexing-Ansatzes gleichzeitig mehrere DSBs erzeugt, können gezielt und simultan mehrere Genloci mutiert werden (Übersicht in Wolter *et al.*, 2019). Dieses sogenannte *stacking* konnte bereits erfolgreich bei unterschiedlichen Sorten angewandt werden (Brooks *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015). Des Weiteren gelang Shen *et al.* die Mutagenese von acht ertrags- oder qualitätsrelevanten Genen in Reis gleichzeitig (Shen *et al.*, 2017b). Neben Mutanten, die homozygote mutierte Allele aller acht Zielgene gleichzeitig tragen, wurden Kombinationen von homozygoten sowie heterozygoten Mutanten für alle Zielgene erhalten. Somit konnte eine breite Palette verschiedener Genotypen, die eine ausreichende genetische Vielfalt für die Selektion bieten, innerhalb nur einer Generation erzeugt werden. Auch eröffnet sich die Möglichkeit, die Polyploidie vieler Kulturpflanzen zu nutzen, um die genetische Vielfalt zu erweitern (Morineau *et al.*, 2017). Indem

mehrere Homologe gleichzeitig editiert werden, kann eine Reihe verschiedenster genetischer Kombinationen mit Einzel-, Doppel- und Vielfachmutanten erzeugt werden, welche dann zur Feinabstimmung des Merkmals dienen können.

Neben dem gezielten Ausschalten bestimmter Gene sind die präzise Editierung sowie die zielgerichtete Integration ektopischer DNA weitere Anwendungsgebiete. Hierfür wird über den Reparaturmechanismus der HR eine Sequenz, die die gewünschten Änderungen trägt und von Homologien zum Insertionsort flankiert ist, ins Genom eingebracht. Diese Methode wird als *Gene targeting* (GT) bezeichnet. Da jedoch in somatischen Pflanzenzellen die Reparatur via NHEJ vorherrscht, ist die Erfolgsrate dieser Methode im Vergleich zur Mutageneserate recht gering. Durch die niedrigen Effizienzen in höheren Pflanzen ist die Anwendung des GT in der Grundlagenforschung, der Pflanzenbiotechnologie und der Züchtung kaum praktikabel. Daher wurden viele Studien durchgeführt, um die Effizienz von HR-basiertem GT zu verbessern (zur Übersicht: Huang und Puchta, 2019; Puchta und Fauser, 2013; Steinert *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016). Anfängliche Verbesserungen wurden vorgenommen, indem DSBs an der Zielsequenz induziert wurden. So konnten GT-Frequenzen in Tabak durch Bruchinduktion mittels I-SceI um bis zu zwei Größenordnungen gesteigert werden (Puchta *et al.*, 1996). In vielen anderen wichtigen Kultursorten wie Mais, Reis und Weizen wurde die DSB-Induktion durch Sequenz-spezifische Nukleasen, beispielsweise dem CRISPR/Cas-System, zur Stimulation des GT verwendet (Endo *et al.*, 2016; Gil-Humanes *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2015a; Li *et al.*, 2016a; Svitashv *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Daher besteht eine Strategie zur Verbesserung der GT darin, die Effizienz und die Natur der Nuklease, die für die Bruchinduktion verwendet wird, anzupassen. Darunter fällt auch die Wahl des Promotors für die Expression der Nuklease (Eid *et al.*, 2016; Hyun *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015). Hier eignen sich besonders Promotoren, die spezifisch in frühen Entwicklungsstadien aktiv sind. So konnte für den Eizell-spezifischen Promotor (EC-P) in Kombination mit der Cas9 aus *Staphylococcus aureus* die höchste Effizienz des GT ermittelt werden (Wolter *et al.*, 2018). Interessanterweise konnte eine zusätzliche Erhöhung der Induktion intrachromosomaler HR durch zielgerichtet eingeführte SSBs im Vergleich zur DSB-Induktion gezeigt werden (Fauser *et al.*, 2014). Ein SSB-induziertes GT wäre von Vorteil, da hier kaum bis keine NHEJ-vermittelte Mutagenese an der Bruchstelle auftritt. Jedoch konnte bisher in Pflanzen keine Verbesserung des GT-Effizienz mittels SSB-Induktion an der Zielsequenz erzielt werden (Wolter *et al.*, 2018).

1.3.2 Genome Engineering

Bisher lag der Fokus der Anwendung des CRISPR/Cas-Systems auf dem *Gene Editing* oder auch *Gene Engineering*, d.h. der Modifikation einzelner Gene (Zhang *et al.*, 2018; Schindele *et al.*, 2020). Durch die Möglichkeit des Multiplexing kann diese Anwendung auch auf die nächste Ebene des *Genome Engineering*, also Umstrukturierungen im genomischen Maßstab, angehoben werden.

Die Induktion großer chromosomaler Veränderungen (*chromosomal rearrangements*, CRs) beruht auf der systematischen Einführung von mehr als einem DSB gleichzeitig. So können Chromosomen gezielt modifiziert und neue Kombinationen der Fragmente erzeugt werden (Abbildung 1-7). Wenn zwei DSBs auf einem Chromosom induziert werden, kann der dazwischenliegende Bereich deletiert oder invertiert werden, eine intrachromosomale Umstrukturierung entsteht. Interchromosomale Umstrukturierungen entstehen durch die Induktion von DSBs auf unterschiedlichen Chromosomen, wodurch es zum Austausch von Fragmenten und zur illegitimen Paarung dieser kommt. Die Induktion zweier DSBs auf heterologen Chromosomen kann zu Translokationen führen. Werden insgesamt vier DSBs, je zwei auf einem Chromosom, eingeführt, können ganze Sequenzbereiche ausgetauscht werden. Die einfachste Form einer CR ist die Deletion. Hier wird der Sequenzbereich zwischen den Brüchen entfernt und die gesamte Information geht verloren. Dadurch sind diese nicht reversibel. Bei Inversionen sowie Translokationen handelt es sich jedoch um Reorganisationen der Chromosomenstruktur, die sich wieder aufheben lassen.

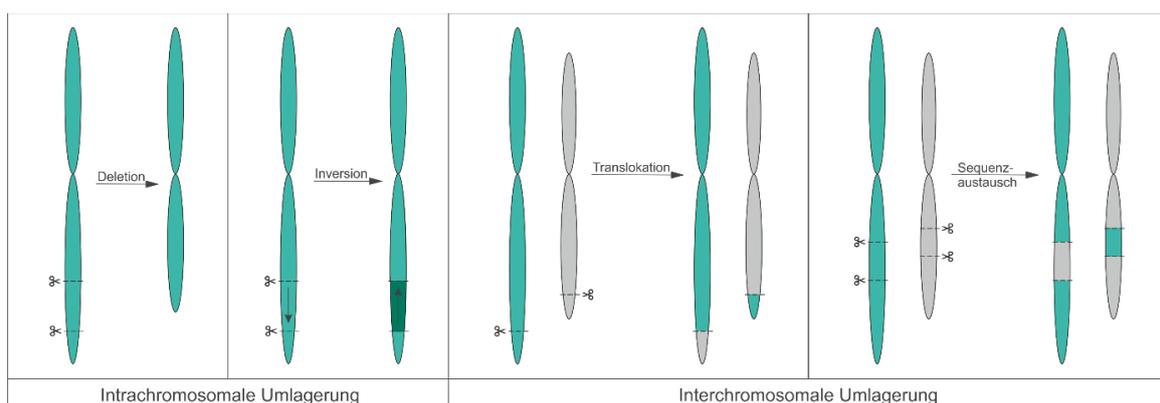


Abbildung 1-7: Induktion großer chromosomaler Veränderungen.

Werden zwei DSB auf einem Chromosom induziert, können intrachromosomale Umlagerungen entstehen. Der Bereich zwischen den Brüchen kann entweder deletiert oder invertiert werden. Werden Brüche auf heterologen Chromosomen induziert, kann dies zum Austausch der Fragmente führen. Bei jeweils einem DSB auf einem Chromosomarm entsteht eine Translokation, werden mehr Brüche auf jedem Arm induziert, ist es möglich, die dazwischenliegende Sequenzinformation auszutauschen.

Große chromosomale Veränderungen treten in Pflanzen natürlich auf und sind eine entscheidende Quelle der Variabilität in Pflanzenpopulationen. Die Reorganisation der Chromosomenarchitektur ist ausreichend, um Fitnessvorteile bei Wachstum unter Stress zu erzielen. Inversionen und Translokationen von Genomsequenzen können zu veränderter Genregulation, neuen Genfunktionen oder der Unterdrückung der meiotischen Rekombination führen. Sie sind verknüpft mit evolutionären Prozessen wie der Ausbildung neuer Spezies sowie der adaptiven Divergenz. Eine artifizielle Generierung oder Aufhebung solcher Strukturvariationen kann dazu beitragen, genetische Kopplungen zwischen QTLs, Resistenzmarkern oder anderen vorteilhaften Merkmalen, oder eine Unterdrückung der meiotischen Rekombination aufzubrechen oder zu erzeugen.

Anfangs wurden zur Induktion von CRs transposable Elemente (Zhang und Peterson, 2004; Krishnaswamy *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2012), Sequenz-spezifische Rekombinasen (Qin *et al.*, 1994; Medberry *et al.*, 1995; Osborne *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2003) und Meganukleasen wie I-SceI (Siebert und Puchta, 2002; Pacher *et al.*, 2007) eingesetzt. Da diese Techniken ungerichtet sind oder die Lox-Stellen und Erkennungssequenzen zunächst in das Genom eingebracht werden müssen, sind die Ansätze unspezifisch, zeitaufwendig und hinterlassen oftmals unerwünschte Spuren. Auch können die CRs nicht an jeder gewünschten Stelle im Genom, sondern nur an den Integrationsstellen der Zielsequenzen induziert werden. Mit dem Einsatz synthetischer Nukleasen konnten auf dem Gebiet des *Genome Engineering* große Fortschritte gemacht werden. Mithilfe von ZFNs konnten Deletionen und Inversionen in Tandemduplikationen von Genen in *Arabidopsis* (Qi *et al.*, 2013a), sowie eine 4,3 kb große Deletion in Tabak (Petolino *et al.*, 2010) induziert werden. Auch TALENs wurden erfolgreich angewendet, um Deletionen und Inversionen unter anderem in Reis-Calli zu induzieren (Shan *et al.*, 2013a). Durch seine einfache Handhabung, seine Eigenschaft zum Multiplexing und seiner hohen Schnitteffizienz kann speziell das CRISPR/Cas-System zur erfolgreichen Induktion von CRs beitragen.

1.4 Zielsetzung

Nicht nur in der Züchtung, sondern auch der Grundlagenforschung ist die gezielte Manipulation von pflanzlichen Genomen von höchstem Interesse. Dabei ist neben der gezielten Editierung bestimmter Gene auch die Umstrukturierung des Genoms möglich.

Bei Säugetieren sind Translokationen (TL) mit verschiedenen genetischen Erkrankungen und Krebs assoziiert, während in Pflanzen TLs eine wichtige Rolle in der Merkmalsvielfalt, der Spezifikation und der Genomentwicklung spielen. Für Züchter kann die Unterdrückung der Rekombination durch solche chromosomalen Umlagerungen problematisch sein, wohingegen die Stabilisierung von Merkmalsbindungen in Elite-Sorten, das Aufbrechen von *linkage drags* und die Unterdrückung von Inzucht im Feld vorteilhaft sein kann. Eine mögliche Lösung für zumindest einige dieser Herausforderungen ist der Aufbau einer Technologie zur effizienten Induktion vererbbarer Translokationen in Sequenz-unabhängiger Weise. Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines solchen CRISPR/Cas-basierten Systems, das auch die effiziente Vererbung der induzierten Translokationen ermöglicht. Dafür sollten zwei DSBs mithilfe der Cas9-Nuklease aus *S. aureus* auf heterologen Chromosomen eingeführt werden, die den reziproken Austausch von Chromosomenfragmenten im Megabasen-Bereich zwischen Chr1 und Chr2 ermöglichen sollten. Die Menge an entstandenen TL sollte quantifiziert werden. Neben dem Wildtyp Col-0 sollte auch die *ku70*-Mutante untersucht und die Verknüpfungspunkte der neu gebildeten TL in beiden Hintergründen analysiert werden, um die Reparaturmechanismen der TL-Bildung in Pflanzen zu charakterisieren. Weiterhin sollte durch die Expression der Cas9-Nuklease unter Kontrolle eines Eizell-spezifischen Promotors eine effiziente Übertragung der induzierten TL-Ereignisse in die nächste Generation erreicht werden. Zur Bestätigung der Unabhängigkeit der TL-Induktion von dem Locus sollte zusätzlich ein Austausch von Fragmenten zwischen Chr1 und Chr5 induziert werden. Dabei war das Ziel, Linien homozygot für beide TLs zu etablieren und diese detailliert zu untersuchen.

Neben dem *Genome Engineering* nimmt auch das *Gene targeting* einen wichtigen Stellenwert in der Pflanzenzüchtung ein. Bisher konnten jedoch nur sehr geringe Effizienzen dieser HR-basierten Methode erreicht werden. Durch die Induktion eines SSBs wurde im Vergleich zur DSB-Induktion eine erhöhte HR-Rate nachgewiesen. In dieser Arbeit war deshalb ein weiteres Ziel mithilfe von Reporterlinien die Mechanismen, die an einer SSB-induzierten HR beteiligt sind, aufzuklären. Hier sollte die Cas9-Nickase aus *S. pyogenes* zur Bruchinduktion in den beiden Mutantenhintergründen *rad54-1* und *rad5a-2* eingesetzt werden. Anschließend sollten die HR-Frequenzen quantifiziert und im Vergleich zum Wildtyp analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

Arabidopsis thaliana

- Ökotyp Columbia (Col-0)
- Reporterlinien DGU.US und IU.GUS (Orel *et al.*, 2003)
- T-DNA Insertionsmutanten (aufgeführt in Tabelle 2-1)

Tabelle 2-1: Auflistung der verwendeten T-DNA Insertionsmutanten.

Die Mutanten wurden aus der SALK- (Alonso *et al.*, 2003) oder GABI-Kat-Kollektion (Kleinboelting *et al.*, 2017) über NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center) bezogen. Aufgeführt sind der Genname, die in *Arabidopsis* zugewiesene Nummer des jeweiligen Genlocus, die Bezeichnung der entsprechenden Mutantenlinie, die offizielle Bezeichnung in den Kollektionen und die Erstbeschreibung der Mutanten.

Genname	Locus	Mutanten- bezeichnung	T-DNA Insertionslinie	Charakterisierung
<i>AtKU70</i>	At1g16970	<i>ku70-1</i>	SALK_123114	(Jia <i>et al.</i> , 2012)
<i>AtRAD54</i>	At3g19210	<i>rad54-1</i>	SALK_038057	(Osakabe <i>et al.</i> , 2006)
<i>AtRAD5A</i>	At5g22750	<i>rad5a-2</i>	SALK_057150	(Chen <i>et al.</i> , 2008)

Escherichia coli

- NEB5 α (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
Dieser Stamm wurde allgemein für Klonierungsarbeiten und die Vermehrung von Plasmiden eingesetzt.
- DB3.1 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) (Bernard und Couturier, 1992)
- One Shot™ *ccdB* survival™ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
Diese beiden Stämme wurden für die Vermehrung von *Gateway-Destination* Vektoren, die ein *ccdB* Gen besitzen, eingesetzt.

Agrobacterium tumefaciens

- GV3101::pMP90 (Koncz *et al.*, 1984)

Dieser Stamm wurde für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Als chromosomaler Marker ist ein Rifampicin-Resistenzgen enthalten, das zusätzlich vorhandene Ti-Plasmid (pTiC58 Δ T-DNA) vermittelt eine Resistenz gegenüber Gentamycin.

2.1.2 Plasmide

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurden folgende, überwiegend in institutseigener Klonierung entstandene Vektoren verwendet:

- pEn-Chimera (Fauser *et al.*, 2014)
- pEn-SaChimera (Steinert *et al.*, 2015)
- pDe-SpCas9-D10A (Fauser *et al.*, 2014)
- pDe-SaCas9 (Steinert *et al.*, 2015)
- pDe-SaCas9-ECP (Wolter *et al.*, 2018)

Die Auflistung der in dieser Arbeit klonierten Plasmide sind im Anhang Kapitel 8.2.1 zu finden.

2.1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer und Oligonukleotide kleiner 50 nt wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert und in entsalzter Form bezogen. Für Oligonukleotide größer 50 nt oder HPLC aufgereinigt wurde bei biomers.net (Ulm) bestellt. In der ddPCR eingesetzte Sonden wurden über die Firma Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. Im Anhang befindet sich eine vollständige Liste der Oligonukleotide mit entsprechenden Sequenzangaben (Anhang Tabelle 8-1, 8-2 und 8-3).

2.1.4 Enzyme und Enzym-Mastermixe

- Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- ddPCR™ Supermix for Probes (Bio-Rad Laboratories, München)
- Gateway® LR Clonase® II Enzym-Mix (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

- Polymerasen:
 - *Taq*-Polymerase (Institut eigene Herstellung, 10x Amplifikationspuffer: 160 mM Ammoniumsulfat, 670 mM Tris, 25 mM MgCl₂, 0,1 % Tween-20, pH 8,8 mit HCl)
 - *DreamTaq*-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
 - Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- Proteinase K (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, München)
- Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- T4 DNA-Ligase (2x Quick Ligase Puffer, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- T7-Endonuklease I (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

2.1.5 Chemikalien

Die Standardchemikalien wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, NL), Merck KGaA (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und VWR International (Darmstadt) in der Regel in *p.a.* Qualität bezogen und sind nicht aufgeführt. Weitere, zusätzlich verwendete Chemikalien und ihre Hersteller finden sich in folgender Liste.

- 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- 4-Methylumbilliferon (4-MU) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Acetosyringon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Agarose SeaKem® LE (Lonza Group Ltd., Basel, CH)
- Beef-Extrakt (GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg)
- Benzylaminopurin (BAP) (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL)
- dNTP Gemisch 10 mM (zuerst bezogen von Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen; anschließend von Jena Bioscience GmbH, Jena)
- Folin-Ciocalteu-Reagenz (Fluka AG, St. Gallen, CH)
- *GeneRuler*TM 1 kb DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- *GeneRuler*TM Low Range DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- Hefe-Extrakt (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL)
- Murashige & Skoog Fertigmedium (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL)
- Natriumhypochlorit-Lösung, 12 % (Carl Roth, Karlsruhe)
- Pepton (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL)

- Plant Agar (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL)
- Silwet Gold L-77 (Hermann Meyer KG, Rellingen)
- Trypton (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL)

2.1.6 Verbrauchsmaterialien und Kits

- Automated Droplet Generation Oil for Probes (Bio-Rad Laboratories, München)
- ddPCR™ 96-Well Plates (Bio-Rad Laboratories, München)
- ddPCR™ Buffer Control for Probes (Bio-Rad Laboratories, München)
- ddPCR™ Droplet Reader Oil (Bio-Rad Laboratories, München)
- DG32™ Automated Droplet Generator Cartridges (Bio-Rad Laboratories, München)
- Elektroporationsküvette 2 mm Elektrodenabstand (VWR International, Darmstadt)
- OptiPlate-96, weiß (PerkinElmer Inc., Waltham, USA)
- PCR Plate Heat Seal, foil, pierceable (Bio-Rad Laboratories, München)
- peqGOLD Cycle-Pure Kit (VWR International, Darmstadt)
- peqGOLD Gel Extraction Kit (VWR International, Darmstadt)
- peqGOLD Plasmid miniprep Kit (VWR International, Darmstadt)
- Pipet Tips for the AutoDG™ System (Bio-Rad Laboratories, München)
- Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

2.1.7 Medien, Lösungen und Puffer

Alle aufgelisteten Medien, Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, mit ddH₂O angesetzt. Bei der Herstellung der Medien wurde nach Einstellen des pH-Wertes nur für Festmedien Agar zugegeben. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Die Zugabe von weiteren Substanzen wie Antibiotika und Herbiziden erfolgte steril erst nach Abkühlung des Mediums unter 50 °C.

2.1.7.1 Medium zur Pflanzenanzucht

GM-Medium: 4,9 g/l Murashige & Skoog Fertigmedium; 10 g/l Saccharose;
(*Germination medium*) pH 5,7 (mit KOH); 7,6 g/l Plant Agar

2.1.7.2 Medium zur Pflanzentransformation

Infiltrationsmedium: 2,5 g/l Murashige & Skoog Fertigmedium; 50 g/l Saccharose; 4,25 µl Benzylaminopurin [1mg/l]; pH 5,7 (mit KOH); 1 ml/l Acetosyringon [100mg/ml in DMSO]; 0,5 ml/l Silwet Gold

2.1.7.3 Medien zur Bakterienkultur

Escherichia coli

LB-Medium:
(*Lysogeny broth*) 10 g/l Pepton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefeextrakt; pH 7,0 (mit NaOH);
17,5 g/l Plant Agar

Agrobacterium tumefaciens

YEB-Medium:
(*Yeast extract broth*) 5 g/l Pepton; 5 g/l Beef-Extrakt; 5 g/l Saccharose; 1 g/l Hefe-Extrakt;
0,493 g/l MgSO₄; 12 g/l Plant Agar

2.1.7.4 Puffer und Lösungen zur DNA-Extraktion

Shorty Extraktionspuffer: 200 mM Tris/HCl (pH 9,0); 400 mM LiCl; 25 mM EDTA; 1 % SDS

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

Nuclei-Lysis Puffer: 24,22 g/l Tris, 18,61 g/l EDTA, 116,88 NaCl, 20,0 g/l
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), pH 8,0 (mit HCl)

5 % Sarkosyl-Lösung: 50,0 g/l N-Laurylsarcosin

Isolierungspuffer (5 ml): 40 mg Natriumdisulfit gelöst in 400 µl ddH₂O, 2,1 ml DNA-
Extraktions-Puffer, 2,1 ml Nuclei-Lysis-Puffer, 400 µl 5 % Sarkosyl-
Lösung

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 9,0); 1 mM EDTA, pH 8,0 (mit HCl)

2.1.7.5 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Ladepuffer (6x): 0,2 % Orange G; 0,05 % Xylencyanol; 10 % Glycerin; 60 mM EDTA

SB-Puffer (20x): 8 g/l NaOH; 47 g/l Borsäure; pH 8,0

SB-Gele: 0,9 % bzw. 2% Agarose in 400 ml 1x SB-Puffer; 15 µl 1 % EtBr

2. Material und Methoden

TAE-Puffer (50x):	242 g/l Tris; 57,1 ml/l Eisessig; 100 ml/l 0,5 M EDTA; pH 8,0
TAE-Gele:	0,9 % bzw. 2% Agarose in 400 ml 1x TAE-Puffer; 15 µl 1 % EtBr

2.1.7.6 Puffer und Lösungen für den Nachweis der β -Glucoronidaseaktivität

GUS Extraktionspuffer mit 1 mM 4-MUG:	50 mM Natriumphosphat (pH 7,0 mit H ₃ PO ₄); 0,1 % SDS; 0,1 % Triton-X; 10 mM EDTA; 1 mM 4-MUG
Lowry „D“:	100 ml 2% Na ₂ CO ₃ in 0,1 n NaOH + (4 ml 2% CuSO ₄ *5H ₂ O + 4 ml 4 % K/Na Tartrat)
1 M Natriumcarbonat-Stoppuffer:	106 g/l Na ₂ CO ₃ (wasserfrei)

2.1.8 Antibiotika und Herbizide

Die in Tabelle 2-2 aufgeführten Antibiotika bzw. Herbizide wurden zur Selektion der verschiedenen Organismen von Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, NL) und Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten Antibiotika und Herbizide.

Angegeben sind die Konzentrationen der bei -20 °C gelagerten Stocks, das jeweils verwendete Lösungsmittel und die eingesetzte Endkonzentration zur Anzucht und Selektion des entsprechenden Organismus.

Antibiotikum/ Herbizid	Lösungs- mittel	Stock- konzentration	<i>A. thaliana</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>E. coli</i>
Ampicillin	ddH ₂ O	100 mg/ml			100 mg/l
Cefotaxim	ddH ₂ O	250 mg/ml	500 mg/l		
Gentamycin	ddH ₂ O	100 mg/ml	75 mg/l	20 mg/l	
Kanamycin	ddH ₂ O	100 mg/ml	30 mg/l		
PPT (DL-Phosphinotricin)	ddH ₂ O	20 mg/ml	6 mg/l		
Rifampicin	DMSO	100 mg/ml		100 mg/l	
Spectinomycin	ddH ₂ O	100 mg/ml		100 mg/l	100 mg/l

2.1.9 Geräte und Zubehör

2.1.9.1 Heizblöcke, Inkubatoren, Rührer, Schüttler

- Inkubationsschüttler 3032 (GFL GmbH, Burgwedel)
- Inkubationsschüttler Certomat® IS (B. Braun Biotech International, Melsungen)
- Inkubationsschüttler Infors HAT Ecotron (Infors AG, Bottmingen, CH)
- Inkubationsschüttler Incu-Shaker 10 L (Benchmark Scientific Inc., Sayreville, NJ, USA)
- Magnetrührer H3760-SE (Benchmark Scientific Inc., Sayreville, NJ, USA)
- Magnetrührer MR Hei-Mix S (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Magnetrührer IKAMAG REC-G (IKA-Werke GmbH + Co. KG, Staufen)
- Magnetrührer Rotilabo®-Mini-Magnetrührer M 3 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Thermomixer comfort und compact 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
- Trockenschrank Heratherm™ OMH 750 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- Trockenschrank Modell M755, M535 (Genlab Ltd., Cheshire, UK)
- Trockenschrank Modell UE-500 (Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach)

2.1.9.2 Thermocycler

- C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, München)
- MyCycler™ (Bio-Rad Laboratories, München)
- SensoQuest Labcycler 48 (SensoQuest GmbH, Göttingen)
- SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- T100™ Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, München)
- Tpersonal Thermocycler (Analytik Jena AG, Jena)

2.1.9.3 Reinraumbänke

- MaxiSafe 2020 1.5 Class II Biological Safety Cabinets (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- Sicherheitswerkbank NU-480-500E (NuAire, Plymouth, USA)
- Reinraumbank Typ HF (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen)
- Reinraumbank Typ KVF (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen)

2.1.9.4 Waagen

- Analysewaage LA164i (VWR International, Darmstadt)
- Präzisionswaage CS-200 (Ohaus Europe GmbH, Nanikon, CH)
- Präzisionswaage 440-47N (Kern & Sohn GmbH, Balingen)

2.1.9.5 Zentrifugen

- CM-70M.07 Schüttelzentrifuge (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)
- MiniSpin Tischzentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg)
- PerfectSpin P (VWR International, Darmstadt)
- Typen Z216M, Z233M-2, Z233MK-2, Z383K (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)
- Zentrifuge/Vortex für PCR-Platten CVP-2 (bioSan, Riga, LV)

2.1.9.6 Weitere Geräte

- Binokular SZB300 (VWR International, Darmstadt)
- Elektroporator: Gene Pulser II, Pulse Controller Plus und Capacitance Extender Plus (Bio-Rad Laboratories, München)
- GEL iX Imager Geldokumentationssystem (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen)
- Infinite® M200 PRO multimode plate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH)
- Nanodrop™ Lite Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- PURELAB classic Reinstwasseranlage (ELGA Labwater, Celle)
- pH-Meter (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Photometer Specord 210 (Analytik Jena AG, Jena)
- PX1™ PCR Plate Sealer (Bio-Rad Laboratories, München)
- Qubit® Fluorometer (Invitrogen™ von Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- QX200™ Automated Droplet Generator (Bio-Rad Laboratories, München)
- QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, München)
- Vortexer VF2 (IKA-Werke GmbH + Co. KG, Staufen)

2.1.10 Software und Datenbanken

- ApE - A plasmid Editor v2.0.55 (M. Wayne Davis, Salt Lake City, Utah, USA)
- Cas-Analyzer, CRISPR RGEN Tools (Molecular Genome Engineering Laboratory, Hanyang University, Korea; <http://www.rgenome.net/cas-analyzer/#!>) (Park *et al.*, 2017)
- CLC Genomics Workbench 10.1.11 (Qiagen Bioinformatics, Hilden)
- Gel iX Imager Software (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen)
- NEBuilder Assembly Tool (<http://nebuilder.neb.com/#!/>)
- NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- QuantaSoft™ Analysis Pro Software 1.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- R Studio (<https://www.rstudio.com/>)
- TAIR - The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>)

Der letzte Zugriff auf die genannten Internetadressen erfolgte am 09.03.2020.

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzen-spezifische Arbeiten

2.2.1.1 Pflanzenanzucht und Lagerung von Saatgut

Anzucht im Gewächshaus

Die Kultivierung der Pflanzen für Samengewinnung, zum Kreuzen oder zur Transformation erfolgte im S1-Gewächshaus des Botanischen Gartens. Vor der Aussaat wurden die Samen zur Stratifikation über Nacht bei 4 °C in Wasser inkubiert. Alternativ wurden 2-3 Wochen alte Pflanzen aus dem Anzuchtraum von Petrischalen mit GM-Festmedium pikiert. Als Substrat wurde ein 1:1-Gemisch aus Floraton3 (Floragard Vertriebs GmbH) und Vermiculit (2-3 mm, Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH) verwendet. Die Anzucht erfolgte bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei einer Lufttemperatur von ca. 22 °C. Die Aussaat und Pflege der Pflanzen wurde vom Personal des Gewächshauses übernommen.

Anzucht im Anzuchtraum

Die Kultivierung der Pflanzen für die Primärtransformandenselektion auf entsprechenden Selektionsmedien, zur Linienetablierung oder zur Genotypisierung erfolgte unter axenischen Bedingungen im Anzuchtraum bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von ebenfalls 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei ca. 24 °C. Hierfür wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert und dann auf GM-Medium gegebenenfalls mit entsprechenden Zusätzen ausgebracht.

Lagerung von Saatgut

Das Saatgut der *Arabidopsis* Pflanzen wurde unter trockenen und dunkeln Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.1.2 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis* Saatgut

Zur Oberflächensterilisation von *Arabidopsis* Saatgut wurde die benötigte Menge an Samen abgemessen und je nach Menge des Saatguts 1 – 1,5 ml 6 %ige Natriumhypochlorit-Lösung zugegeben. Die Samen wurden unter Schütteln 6 min inkubiert und anschließend bei 4000 UPM für 3 min abzentrifugiert. Alle

folgenden Arbeitsschritte wurden unter einer Reinraumbank durchgeführt. Nach Abnahme der 6%igen Natriumhypochlorit-Lösung wurden die Samen mit 1 ml ddH₂O gewaschen. Dieser Waschschrift wurde mindestens drei Mal wiederholt bis der Überstand klar war, bevor die Samen zur Kältestratifikation bei 4 °C über Nacht in 500 µl ddH₂O aufgenommen wurden.

2.2.1.3 Kreuzungen

Für Rückkreuzungsanalysen wurden verschiedene *Arabidopsis*-Linien miteinander gekreuzt. Dabei wurden beide zu kreuzende Linien jeweils als Mutter- wie auch als Vaterpflanzen eingesetzt. Zunächst wurden bei den ca. vier Wochen alten Mutterpflanzen die Schoten, die schon geöffneten Blüten, die sehr jungen Knospen und die nicht benötigten Blütenstände entfernt. Durch Abtrennen der Kron- und Kelchblätter, sowie der Staubblätter wurden pro Blütenstand etwa drei Fruchtknoten mit Pinzetten freipräpariert und diese anschließend durch Auftupfen von Staubblättern geöffneter Blüten der Vaterpflanzen befruchtet. Hierbei wurden die Pollen auf die Narbe des Fruchtknotens übertragen. Die befruchteten Blütenstände wurden farbig markiert, sodass die nachwachsenden Blütenstände in regelmäßigem Abstand entfernt werden konnten. Die Mutterpflanzen wurden nun bis zur Samenreife nach etwa zwei Wochen weiter im S1-Gewächshaus angezogen. Nach der Ernte wurde das Saatgut bei 37 °C getrocknet.

2.2.1.4 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Arabidopsis*

Für die Agrobakterien-vermittelte stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde das Floral-Dip Protokoll (verändert nach Clough und Bent, 1998) angewandt. Zunächst wurde eine 50 ml Vorkultur (YEB; Rifampicin, Spectinomycin, Gentamycin) mit einer Kolonie der nach Elektroporation (Kapitel 2.2.2.2) auf dem Selektionsmedium gewachsenen Agrobakterien, die das binäre Plasmid mit T-DNA enthalten, angeimpft und bei 28 °C und 200 UPM über Nacht inkubiert. Zum Ansetzen der Hauptkultur wurden entweder 180 µl dieser Vorkultur oder 500 µl eines aus einer Vorkultur hergestellten Glycerinstocks in 400 ml YEB-Medium (Rifampicin, Spectinomycin, Gentamycin) überführt. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte analog zur Vorkultur. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur abzentrifugiert (15 min, 20 °C, 4000 UPM) und in 800 ml frisch angesetztem Infiltrationsmedium resuspendiert. Für die Transformation wurden ca. 4 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet, die zuvor von bereits gebildeten Schoten und schon geöffneten Blüten befreit wurden. Diese wurden für 30 Sekunden bis zur Rosette in die Agrobakterien-Suspension getaucht. Danach wurden die Pflanzen horizontal über Nacht in einer Kiste unter Lichtausschluss und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zum

Abwaschen des Agrobakterien-haltigen Infiltrationsmediums wurden die Pflanzen am folgenden Tag mit Leitungswasser abgesprüht und anschließend bis zur Ernte im S1-Gewächshaus kultiviert.

2.2.1.5 Phänotypenanalysen und Fertilitätstests

Zum Vergleich des Phänotyps verschiedener Linien und zur Untersuchung der Fertilität dieser wurden diese gemeinsam im Gewächshaus angezogen. Hier wurde besonders auf gleiche Behandlung und gleichen Standort der Pflanzen geachtet. Für Phänotypenanalysen wurden je 10 Pflanzen einer Linie nach 4 Wochen fotografiert, um Unterschiede im Wuchs festzuhalten. Die Fertilität wurde anhand der Schotenlänge und Samenanzahl bestimmt. Dafür wurden für alle zu untersuchenden Linien gleichzeitig von je 5 Pflanzen 5 Schoten kurz vor der Samenreife abgenommen und in 70 % Ethanol zum Entfärben überführt. Anschließend wurden diese unter dem Binokular vermessen und die Samen pro Schote ausgezählt.

2.2.1.1 Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in *A. thaliana*

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der Aktivität von β -Glucuronidase (GUS) in pflanzlichem Gewebe mittels quantitativer Analyse.

Die Quantifizierung der GUS-Aktivität erfolgte mittels eines Fluoreszenz-basierten Testsystems. Das Protokoll wurde dem „Arabidopsis – A Laboratory Manual“ (Weigel und Glazebrook, 2002) entnommen. Hierfür wurden ebenfalls 14 Tage alte Primärtransformanten verwendet. Pro Ansatz wurden circa 200 mg Pflanzenmaterial in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß abgewogen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ohne Auftauen wurde das Material mit einem Pistill fein zerkleinert. Nach Zugabe von 150 μ l des GUS-Extraktionspuffers und Zentrifugation für 10 min bei 15.000 UPM und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Der Überstand wurde 1:2 mit GUS-Extraktionspuffer verdünnt und 10 μ l der Verdünnung zu 1 ml Reaktionsmix (1 mM 4-MUG in GUS-Extraktionspuffer) zum Start der Reaktion zugegeben. Die Umsetzung des Substrates 4-MUG zu dem fluoreszierenden Produkt 4-Methylumbilliferon wird durch die enzymatische Aktivität der GUS katalysiert. Zur Aufnahme der Enzymkinetik wurden nach drei Inkubationsschritten bei RT von je 10 min jeweils 100 μ l aus dem Ansatz entnommen und zum Abstoppen der Reaktion zu 900 μ l vorgelegtem 1 M Natriumcarbonat-Stopppuffer gegeben. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im *plate reader* bei 365 nm Anregungslicht und 455 nm Emission.

Um die so erhaltenen Werte der Umsatzraten auf die Proteinkonzentration in den verschiedenen Proben zu normalisieren wurde anschließend ein Lowry-Assay durchgeführt. Dafür wurden zunächst die Proteine gefällt, indem zuerst 50 μ l des Überstandes aus der vorherigen Kältezentrifugation in 1 ml H₂O

mit 50 µl 2 % Na-Desoxychelate versetzt wurden. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT und Zugabe von 30 % TCA entstand eine milchige Trübung. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 14.000 UPM abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgte die Proteinbestimmung. Das Pellet wurde in 1 ml frisch angesetztem Lowry „D“ durch Vortexen gelöst und in ein Glasröhrchen überführt. Nun wurde nochmals 1 ml Lowry „D“ sowie 100 µl 5 % SDS-Lösung zugegeben und der Ansatz anschließend auf dem Vortexer mit 200 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz (Folin/H₂O 1:2) vermischt. Nach 60 min Inkubation im Dunkeln konnten die gebildeten Proteinkomplexe bei 650 nm im Photometer gemessen und anhand einer Standardkurve mit BSA die Proteinkonzentration in den einzelnen Proben berechnet werden.

2.2.2 Mikrobiologische Arbeiten

2.2.2.1 Transformation und Kultur von *Escherichia coli*

Für die Transformation mittels der Calciumchlorid-Methode durch Hitzeschock wurden zunächst die bei -80 °C gelagerten Bakterien des kompetenten *E. coli* Stammes NEB5α oder DB3.1 auf Eis aufgetaut. Pro Reaktionsansatz wurden 100 µl *E. coli*-Suspension mit dem zu transformierenden Ansatz der Plasmid-DNA durchmischt und die Zellen wurden weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C und sofortige Kühlung für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl vorgewärmtem, flüssigem LB-Medium zum Transformationsansatz wurde die Zellsuspension für 45-90 min bei 500 UPM inkubiert. Zur Selektion der Bakterien, die das Plasmid mit Resistenzkassette aufgenommen hatten, wurde die Zellsuspension abzentrifugiert, das Pellet in ca. 100 µl LB-Medium aufgenommen und vollständig auf LB-Selektionsmedium ausplattiert. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Für die Präparation der Plasmid-DNA wurde in einem Kulturröhrchen 5 ml flüssiges LB-Selektionsmedium mit einer durch Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.3.2) als positiv bestätigte Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 UPM inkubiert. Anschließend wurde von 4 ml der Flüssigkultur die Plasmid-DNA mit Hilfe des peqGOLD Plasmid miniprep Kits nach Herstellerangaben isoliert. Zur längerfristigen Lagerung der *E. coli*-Kulturen bei -80 °C wurden aus 700 µl der Übernachtskultur und 300 µl Glycerin Glycerinstocks hergestellt.

2.2.2.2 Transformation und Kultur von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte mittels Elektroporation. Zunächst wurden Bakterien des kompetenten Stammes GV3101 bei -20 °C, dann bei 4 °C langsam aufgetaut. 50 µl der aufgetauten Agrobakterium-Suspension wurden anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und vorsichtig mit 1 µl des Plasmids (> 80 ng) vermischt. Die Transformation der Zellen erfolgte im Elektroporator bei 2,5 kV Spannung, 25 µF Kapazität und 200 Ω Widerstand für eine Pulsdauer von 5 ms. Im Anschluss an die Elektroporation wurden 500 µl flüssiges YEB-Medium in die Küvette gegeben und das Gemisch in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Transformationsansatz wurde nun für 30 min bei 28 °C und 200 UPM schüttelnd inkubiert. Im letzten Schritt wurden je Transformationsansatz 50 µl auf YEB-Selektionsmedium mit Rifampicin, Gentamycin und Spectinomycin zur Selektion der Agrobakterien, die sowohl das Helferplasmid als auch das transformierte Konstrukt enthalten, ausplattiert. Diese Platten wurden für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

Die Kultivierung und Vermehrung der Agrobakterien erfolgte in Flüssigkulturen von 10-50 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen (Rifampicin, Spectinomycin, Gentamycin). Glycerinstocks zur langfristigen Lagerung wurden analog zu Kapitel 2.2.2.1 hergestellt.

2.2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.3.1 DNA-Isolierung aus *Arabidopsis*

Zur Gewinnung von genomischer DNA (gDNA) aus *A. thaliana* wurden zwei verschiedene Protokolle angewandt. Für Routineanalysen wie Genotypisierungen wurde die gDNA mittels einer zeitlich optimierten Methode, der sogenannten „Shorty-Methode“, aus einzelnen Blättern der Pflanzen isoliert. Zur Analyse mittels sensitiverer Methoden, wie die der ddPCR oder dem *Next Generation Sequencing*, wurde besonders reine DNA in hoher Ausbeute benötigt. Hierfür wurde die qualitativ und quantitativ optimierte Präparationsmethode verwendet.

Schnelle DNA-Isolierung

Für das zeitlich optimierte Protokoll zur gDNA-Isolierung wurde Material von 10 – 14 Tage alten Keimlingen verwendet. Je zu untersuchender Pflanze wurde ein Rosettenblatt mit einer Schere abgetrennt und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit einem Pistill zerkleinert. Nach dem mechanischen Aufschluss des Pflanzenmaterials wurde die DNA durch Zugabe von 500 µl Shorty-Puffer aus dem

Homogenisat herausgelöst und größere Blattbestandteile durch Zentrifugation für 5 min bei 12.000 UPM abgetrennt. Durch Überführen von 400 µl des Überstandes zum gleichen Volumen an vorgelegtem Isopropanol in einem neuen 1,5 ml-Reaktionsgefäß und sorgfältigem Invertieren wurde die DNA gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14.000 UPM wurde der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer gelöst und entweder direkt zur Genotypisierung mittels PCR eingesetzt oder bei RT gelagert. Für die Vorselektion einer möglichst vielversprechenden Linie für anschließende Analysen wurde mittels desselben Verfahrens aus einem Pool von bis zu 40 Blättern einzelner Pflanzen die genomische DNA isoliert. Dabei wurde darauf geachtet, dass nach Zugabe des Shorty-Puffers keine größeren Blattfragmente mehr zu sehen waren, sondern diese sorgfältig zerkleinert wurden. Die Aufnahme des DNA-Pellets erfolgte nach Trocknung in 200 µl TE-Puffer.

Qualitativ und quantitativ optimierte DNA-Isolierung

Zur Isolation besonders reiner DNA in hoher Menge wurden 100 transformierte, ganze Keimlinge der T1-Generation selektiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wenn nötig bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung zwischengelagert. Diese wurden nun mithilfe eines Porzellanmörser mit Pistill zu einem feinen Pulver zerkleinert. Dabei wurde durch Vorkühlen des Arbeitsmaterials und Zugabe von flüssigem Stickstoff ein Auftauen des Pflanzenmaterials vermieden. Das so entstandene Homogenisat wurde in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 5 ml Isolierungspuffer versetzt und gründlich auf einem Vortexer gemischt. Nach anschließender Inkubation für 60 min im 65 °C warmen Wasserbad erfolgte die Zugabe von 5 ml Chloroform zur Abtrennung der Proteine und Lipide von der DNA. Die Probe wurde bei 4.500 UPM und 4 °C für 15 min zentrifugiert und die von den übrigen Phasen nun klar getrennte, wässrige Epiphase in ein neues 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Degradierung der RNA wurde 100 µl RNase A (2 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von kaltem Isopropanol und sorgfältigem Invertieren wurde die genomische DNA gefällt und anschließend bei 4.500 UPM und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes wurde das so entstandene DNA-Pellet zwei Mal mit 2 ml 70 %igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 4.500 UPM und 4 °C für 5 min) und schließlich über Nacht bei RT getrocknet. Zum Lösen des Pellets wurden 500 µl TE-Puffer zugegeben und die Probe für mehrere Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Konnte das Pellet so nicht vollständig gelöst werden, erfolgte eine weitere Inkubation bei 4 °C über Nacht und am nächsten Tag wiederum schüttelnd bei 37 °C. Zum Schluss wurde die gelöste DNA in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient zur Vervielfältigung definierter Abschnitte auf der DNA. Sie wurde in dieser Arbeit für unterschiedlichste Fragestellungen wie Genotypisierung, Quantifizierung oder Kontrolle transformierter Bakterien eingesetzt. Je nach Fragestellung wurden verschiedene DNA-Polymerasen nach Herstellerangaben verwendet. Für *Screening*-Anwendungen wie Genotypisierungen oder Kolonie-PCR wurde die institutseigene *Taq*-Polymerase oder die *DreamTaq* eingesetzt. Für die Amplifikation von Fragmenten für Klonierungen oder das NGS, für welche eine *proof-reading* Polymerase erforderlich war, wurde die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase genutzt. Die verwendeten Primer-Oligonukleotide, ihre PCR-Bedingungen und die nach Formel (1) berechneten *Annealing*-Temperaturen (T_m) sind im Anhang, Tabelle 8-1 bis 8-6, aufgelistet.

$$(1) \quad T_m [^{\circ}C] = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

PCR-basierte Genotypisierung zur Identifikation von Translokationsereignissen

In dieser Arbeit sollten Pflanzenlinien etabliert werden, die durch das CRISPR/Cas-System induzierte Translokationen homozygot tragen. Um diese zu identifizieren wurde eine PCR-basierte Genotypisierung durchgeführt. Für die Amplifikation wurde die *DreamTaq* nach Herstellerangaben verwendet. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass diese jeweils die Schnittstellen der Cas9-Nuklease überspannen. Hiermit wurde der WT nachgewiesen. Kombiniert man den *forward* Primer des Primerpaares für das eine Chromosom mit dem *reverse* Primer des zweiten Primerpaares auf dem anderen Chromosom und *vice versa* dann weist eine Bande im Gel auf eine erfolgreiche Translokation hin (Abbildung 2-1). Durch die Durchführung aller vier PCRs konnte festgestellt werden, ob eine Linie die Translokation homozygot reziprok, heterozygot reziprok, nur an einem Verknüpfungspunkt oder gar nicht trägt.

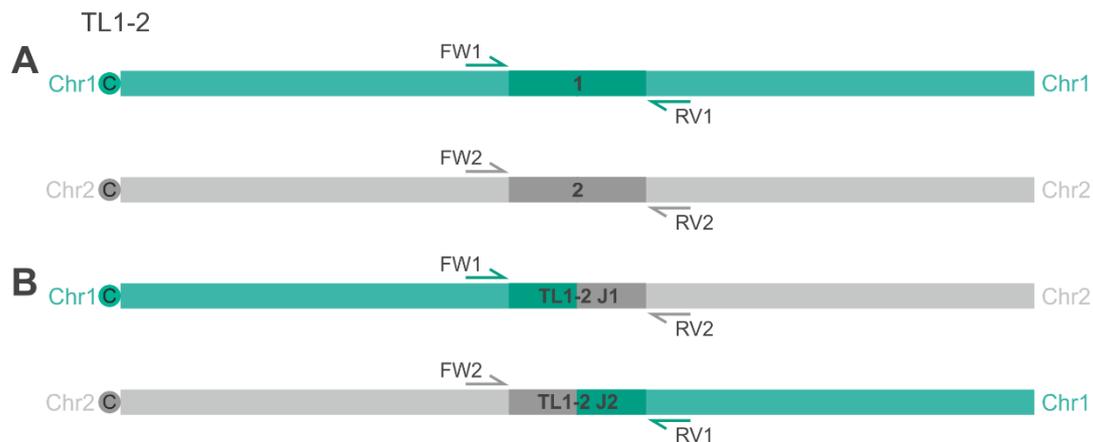


Abbildung 2-1: Primerkombinationen zur Identifikation von Translokationsereignissen.

(A) Beide Primerkombinationen überspannen die Cas9-Schnittstellen auf den beiden Chromosomen. Wurde keine Translokation induziert, entsteht hierbei jeweils ein PCR-Produkt für den WT. (B) Durch die Kombination des FW-Primers des einen Chromosomenabschnittes mit dem RV-Primer des anderen Chromosoms kann nur eine Amplifikation stattfinden, wenn der Bereich, den der RV-Primer bindet, transloziert ist. So können die jeweiligen TL-Junctions nachgewiesen werden.

Droplet Digital PCR

Die *Droplet Digital PCR* (ddPCR) ist eine besonders sensitive Variante der PCR und damit gut geeignet, seltene Ereignisse zu detektieren. Daher wurde die ddPCR in dieser Arbeit zur absoluten Quantifizierung von Translokationsereignissen eingesetzt.

Die ddPCR zeichnet sich durch eine starke Partitionierung, d.h. Vereinzelung der DNA in einem Reaktionsansatz auf eine Vielzahl an Öl-Emulsions-Tröpfchen (*droplets*), aus. Diese Aufteilung ermöglicht die Messung von Tausenden von unabhängigen Amplifikationsereignissen innerhalb einer einzelnen Probe. Durch die Verwendung fluoreszierender Moleküle wie EvaGreen oder mit einem Fluorophor markierte Sonden kann der Erfolg einer Amplifikation sichtbar gemacht werden. Da Sonden gegenüber EvaGreen zum einen spezifisch an die DNA binden, sodass nur bei einer erfolgreichen Amplifikation das Fluorophor freigesetzt wird, und zum anderen eine Duplex-Reaktion ermöglichen, wurden diese aufgrund der beiden Vorteile in dieser Arbeit eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde nach Herstellerangaben mit dem ddPCR™ Supermix for Probes (Bio-Rad) vorbereitet. Dabei wurde eine FAM-markierte Sonde zur Detektion der Translokation und eine HEX-markierte Sonde zur Normalisierung auf die eingesetzte Menge an gDNA verwendet (Abbildung 2-2, Sequenzen im Anhang Tabelle 8-3). Zusätzlich wurde dem Ansatz ein Restriktionsenzym (5 Units) zugefügt, um durch die Fragmentierung die DNA besser auf die einzelnen Tröpfchen zu verteilen und für die PCR zugänglich

zu machen. Eine Übersicht der verschiedenen PCR-Ansätze ist Tabelle 8-4 im Anhang zu entnehmen. Zur Untersuchung einer Probe wurde ein entsprechend großer Mastermix mit allen Komponenten erstellt und auf 8 Wells der PCR-Platte verteilt. Als Kontrollen dienten der untransformierte WT sowie H₂O als Negativkontrolle (NTC). Nach Vorbereitung der Reaktionsansätze und der PCR-Platte fand die Partitionierung im QX200™ Automated Droplet Generator statt. Anschließend wurde die ddPCR entsprechend der Angaben des Herstellers in einem Thermocycler mit einer *ramp rate* von 2 °C/s durchgeführt. Ausgelesen wurde die ddPCR im QX200™ Droplet Reader, wobei *droplets* mit Fluoreszenzsignal als positiv und *droplets* ohne Fluoreszenzsignal als negativ gewertet werden. So wird eine absolute digitale Quantifizierung ermöglicht. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software QuantaSoft™ Analysis Pro 1.0 und Excel ausgewertet. In der Software wurden alle Reaktionen einer Probe zusammengefasst und mittels Poisson-Verteilung die Translokationsfrequenz bestimmt.

2.2.3.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden aus verschiedenen Reaktionsansätzen wie PCR oder Restriktionsverdau aufgereinigt, um diese für anschließende Analysen von störenden Komponenten wie Pufferbestandteilen, kleineren Oligonukleotiden und anderen Enzymen zu befreien. Dabei wurde entweder das Cycle Pure Kit (VWR) zur direkten Aufreinigung aus dem Reaktionsansatz oder das Gel Extraction Kit (VWR) zur vorherigen Auftrennung der Fragmente nach Größe und Aufreinigung der gewünschten Bande aus dem Gel nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Elution der DNA erfolgte in 30 – 50 µl H₂O, je nach Größe der Fragmente und gewünschter Konzentration.

2.2.3.4 DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung von DNA wurde mit Hilfe des Nanodrop™ Lite Spektralphotometer (Thermo Scientific) für Plasmid-DNA und PCR-Produkte durchgeführt. Genomische DNA aus *A. thaliana* für den Einsatz in der ddPCR sowie aufgereinigte PCR-Amplikons für NGS Analysen wurden nach Herstellerangaben mit dem Qubit® Fluorometer (Invitrogen) gemessen.

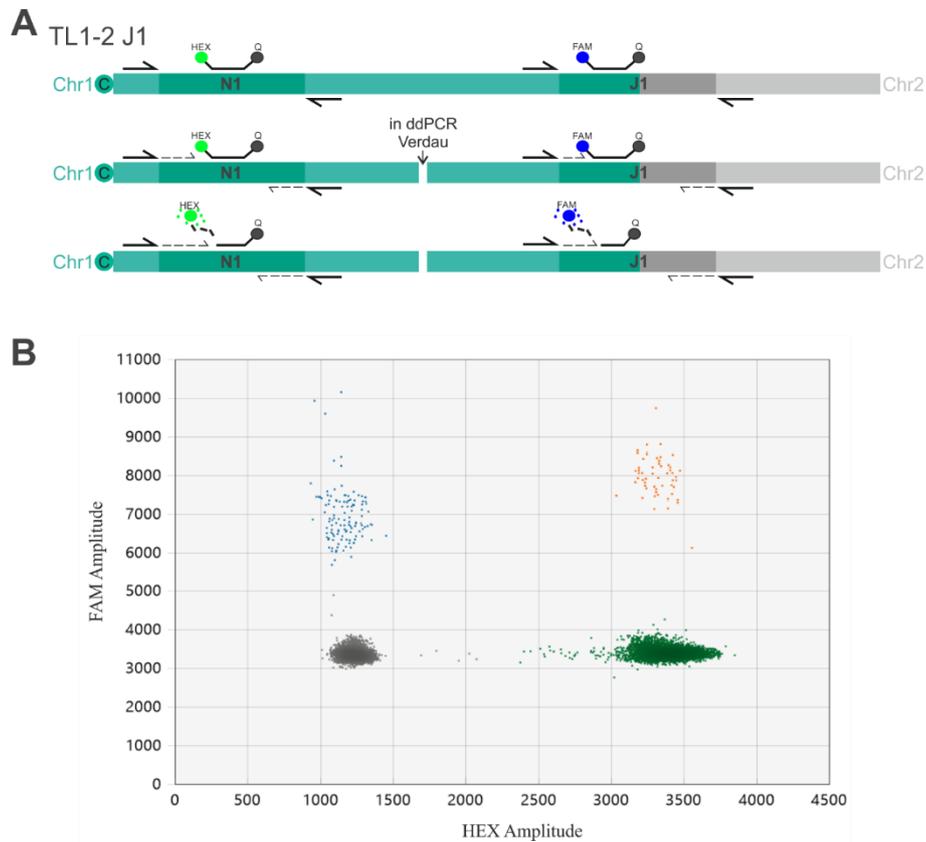


Abbildung 2-2: Droplet Digital PCR.

(A) Zur Quantifizierung von Translokationsereignissen wurde eine Sonden-basierte *Droplet Digital PCR* durchgeführt. Dabei konnte in einer Duplex-Reaktion sowohl die Translokation sowie die Menge an eingesetzter gDNA gleichzeitig gemessen und somit mittels Normalisierung auf die DNA-Konzentration die TL-Frequenz berechnet werden. Zur besseren Verteilung der DNA-Moleküle auf die einzelnen *droplets* und zur Vermeidung von PCR-Artefakten wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Durch die Verlängerung der Primer und die 5'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase werden die Fluorophore (FAM und HEX) freigesetzt. (B) Eine erfolgreiche Amplifikation kann so über die Messung der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dabei wurden in der nachfolgenden Analyse die *droplets* in vier Klassen eingeteilt. Negative *droplets*, in denen keine Amplifikation stattgefunden hat (grau) oder positive *droplets*, in denen entweder die Zielsequenz amplifiziert wurde (blau) oder die Referenzsequenz zur Normalisierung enthalten war (grün) oder in denen diese beiden Amplifikationen zusammen stattfanden (orange).

2.2.3.5 Sequenzierung

Sanger Sequenzierung

Zur Analyse auf Sequenzebene mittels Sanger-Sequenzierung wurden zuvor aufgereinigte PCR-Fragmente oder Plasmide an Eurofins GATC (Konstanz) (ehemals GATC Biotech) gesendet. Dabei wurden die Plasmide je nach Größe in Konzentrationen zwischen 30 und 100 ng/μl und PCR-Fragmente in Konzentrationen zwischen 10 und 50 ng/μl in einem Volumen von 20 μl verdünnt. 20 μl Primer (10 μM) wurden separat mitgeschickt. Die Sequenzierungsergebnisse konnten nach etwa zwei Tagen online heruntergeladen werden und wurden anschließend mit der Software ApE analysiert.

Next Generation Sequencing (NGS)

Für *Next Generation Sequencing* (NGS) Anwendungen wurden zwei verschiedene Plattformen verwendet, die Illumina HiSeq und die Illumina MiSeq. Beide Plattformen unterscheiden sich durch die Anzahl der *read pairs* pro Ansatz (12 Mio. bzw. 80.000 – 90.000) und der *read* Länge (2x250 bp bzw. 2x300 bp). Die Durchführung des NGS als auch die *library preparation* wurde an die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) für HiSeq Analysen (NGSelect Amplicon) bzw. später an GATC Eurofins (Konstanz) für MiSeq Analysen (InView Microbiome Profiling 3.0 2nd PCR) ausgelagert. Nur die Voramplifikation der Proben fand vor Ort statt. Hierfür wurde die Q5® HighFidelity DNA Polymerase verwendet. Die zur Amplifikation eingesetzten Primer wurden mit Überhängen versehen. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang Tabelle 8-1 zu finden. Für die HiSeq Plattform waren die Überhänge, sogenannte *tags* oder *barcodes*, 6 bp lang und unterschieden sich für jedes generierte Amplicon, um später die Zuordnung der Daten zu den entsprechenden Proben aus dem Gesamtpool der Analyse zu gewährleisten. Die PCR-Fragmente wurden aufgereinigt und 20 Amplifikationen gesammelt in 100 μl zu 10 ng/μl an den Sequenzierdienstleister verschickt. Für die MiSeq Analysen wurden den Primern vorgegebene Überhänge, die Illumina Adapter, angefügt. Nach der Amplifikation waren keine weiteren Schritte mehr nötig und die PCR-Produkte wurden einzeln versendet.

Zur Auswertung der erhaltenen Sequenzierungsdaten wurden die HiSeq Daten zunächst in der CLC Genomics Workbench dem *Demultiplexing* und dem *Merging of paired-end reads* unterzogen. Die sortierten und zusammengefügte Einzelsequenzen (*reads*) wurden folgend im Cas-Analyzer (Park *et al.*, 2017) mit der Referenzsequenz verglichen und analysiert. Die verwendeten Parameter waren wie folgt: *Comparison Range* (R) = 100 bp, *minimum frequency* (n) = 1, Kein optionaler WT Marker (r). Die ausgegebene Textdatei mit den so generierten Daten wurde in R-Studio genauer analysiert. Der hierfür benutzte Algorithmus wurde von Tobias Zundel entwickelt und von Anna Neubauer auf die spezielle

Fragestellung dieser Arbeit angepasst (Anhang Kapitel 8.3). Bei der Auswertung der MiSeq generierten Sequenzierungsdaten konnte direkt mit der Analyse mittels des Cas-Analyzer gestartet werden.

2.2.3.6 Klonierungen

Im Allgemeinen wurden die Klonierungen nach den Methoden beschrieben in Sambrook und Russell 2001 durchgeführt. Die gängigen Schritte einer klassischen Klonierung wie Restriktionsverdau über Typ II Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung und Ligation mithilfe einer T4-Ligase wurden gemäß den Herstellerangaben zu den entsprechenden Enzymen durchgeführt. Für Rekombinationsklonierung wurde das Gateway® Verfahren oder die Methode des Gibson-Assembly® angewandt. Als letzter Schritt wurde der Klonierungsansatz immer in kompetente Bakterienzellen transformiert (Kapitel 2.2.2).

CRISPR/Cas basierte Endonukleasen

In dieser Arbeit wurden einerseits CRISPR/Cas basierte Endonukleasen aus *S. aureus* mit zwei sgRNA-Expressionskassetten, sowie andererseits CRISPR/Cas basierte Nickasen aus *S. pyogenes* verwendet. Zur Klonierung der *S. aureus* Konstrukte wurden die Gateway® kompatiblen Plasmide pEn-SaChimera (*Entry*-Vektor) und pDe-SaCas9 (*Destination*-Vektor) (Steinert *et al.*, 2015), zur Klonierung der *S. pyogenes* Konstrukte entsprechend die Plasmide pEn-Chimera und pDe-SpCas9-D10A (Fauser *et al.*, 2014) eingesetzt.

Zunächst wurde die Zielsequenz der Endonuklease ausgewählt. Diese Sequenz besteht aus 20 Nukleotiden komplementär zur sgRNA, dem sogenannten Protospacer, gefolgt von einem für die entsprechende Endonuklease spezifischen PAM (5´-NGG für *S. pyogenes*, 5´-NNGGGT für *S. aureus*). Zur Klonierung der Protospacer in die über *BsbI* linearisierten *Entry*-Vektoren wurden den zueinander komplementären Oligonukleotiden, die dem Protospacer entsprechen, 4 nt Überhänge zugefügt, die passenden ssDNA-Moleküle miteinander hybridisiert und anschließend über die Methode der klassischen Klonierung in den Zielvektor eingefügt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für die CRISPR/Cas Klonierung sind in Tabelle 8-2 im Anhang aufgeführt. Anschließend folgte die Übertragung der programmierten sgRNA-Expressionskassetten von den *Entry*-Vektoren in die *Destination*-Vektoren. Für die *S. aureus* Konstrukte mit zwei sgRNAs erfolgte zunächst die Klonierung der ersten Kasette aus dem pEn-SaChimera in den *Destination*-Vektor pDe-SaCas9 über die *MluI* und *Bsu36I* Schnittstellen und anschließend der Transfer der zweiten Kasette mittels Gateway® LR Reaktion in den erhaltenen *Destination*-Vektor. Wurde nur eine sgRNA benötigt, wurde diese aus dem pEn-Chimera in den pDe-SpCas9-D10A direkt über die Gateway® LR Reaktion eingebracht.

Austausch der Resistenzkassetten

Um eine Selektion transformierter T-DNA Insertionsmutanten zu ermöglichen, die oftmals bereits eine Kanamycin-Resistenzkassette (*npt II*) tragen, wurde diese in den *Destination*-Vektoren pDe-*Sa*Cas9 mittels *SbfI* und *PmeI* und pDe-*Sp*Cas9-D10A mittels *HindIII* gegen die *bar*-Kassette (PPT-Resistenz) bzw. Gentamycin-Resistenzkassette ausgetauscht.

Kontrollplasmide zur ddPCR-Etablierung

Für die Etablierung der Primer- und Sondenkombinationen in der ddPCR wurden Kontrollplasmide kloniert, die die theoretischen, nach der Translokation (TL) entstehenden reziproken *Junctions* enthalten. Dafür wurden für die Translokation zwischen Chr1 und Chr2 Gibson-Klonierungen von jeweils zwei Fragmenten pro *Junction* in den pEn-Chimera durchgeführt.

Zunächst wurden Primer mit Überhängen mittels des NEBuilder Assembly Tools (<http://nebuilder.neb.com/#/>) designt (Anhang, Tabelle 8-1). Für das Kontrollplasmid TL1-2 K1 (TL zwischen Chr1 und Chr2, *Junction* 1) umspannt das erste Fragment einen Bereich des centromerständigen Chromosoms 1 bis zur Schnittstelle der Cas9-Nuklease 3 bp *upstream* des PAM, das zweite Fragment einen Teil des zu translozierenden Bereichs des anderen Chromosoms 2 ab der Cas9-Schnittstelle Richtung Telomer. Dies gilt analog für die theoretische, reziproke *Junction* 2, wobei für das Konstrukt TL1-2 K2 die entsprechend anderen Bereiche amplifiziert und kloniert wurden. Um eine Unterscheidung der Kontrollplasmide von den über CRISPR/Cas induzierten Translokationen zu ermöglichen und eine mögliche Kontamination zu umgehen, wurde eine *I-SceI*-Schnittstelle zwischen den beiden aus gDNA amplifizierten Fragmenten über die Primerüberhänge eingefügt. Nach Amplifikation der jeweiligen Fragmente mittels PCR wurden diese aufgereinigt und über eine Gibson-Reaktion in die entsprechenden vorverdauten Vektoren eingebracht.

Vor dem Einsatz in der ddPCR wurden die Kontrollplasmide TL1-2 K1 und K2 mit *NotI* verdaut und stark verdünnt ($2 \cdot 10^{-3}$ ng/ μ l).

2.2.3.7 Untersuchung der Cas9-Schnitteffizienz

CAPS-Marker Restriktionsverdau

War es möglich, den Protospacer für die Cas9 Endonuklease so zu wählen, dass eine Restriktionsschnittstelle über dem Schnittpunkt 3 bp *downstream* des PAMs lag, wurde der CAPS-Marker Restriktionsverdau zur Ermittlung der Cas9-Schnitteffizienz eingesetzt. Zunächst wurde hierfür ein circa 1 kb großer Abschnitt mit der entsprechenden Schnittstelle aus gDNA amplifiziert und

dieses Fragment mit dem Cycle Pure Kit (VWR) aufgereinigt. Anschließend wurde eine Restriktionsverdau mit dem entsprechenden Enzym angesetzt. Dabei können nur Fragmente verdaut werden, die keine durch den mittels Cas9 eingeführten DSB entstandene Mutation enthalten. Die Banden wurden mittels Gelelektrophorese in einem Ethidiumbromidgel aufgetrennt und unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht. Es wurde immer eine WT-Kontrolle mitgeführt.

T7-Endonuklease Assay

War keine Restriktionsenzymstichstelle 3 bp *downstream* des PAM im Protospacer enthalten, wurde der T7-Endonuklease Assay zur Ermittlung der Cas9-Schnitteffizienz durchgeführt. Hierfür wurde ebenfalls ein circa 1 kb großer Abschnitt mit der entsprechenden Schnittstelle aus gDNA amplifiziert und dieses Fragment mit dem Cycle Pure Kit (VWR) aufgereinigt. Danach erfolgte die Denaturierung der Amplikons und die erneute, zufällige Zusammenlagerung der Einzelstränge im Thermocycler nach Herstellerangaben, wobei auch Heteroduplexe entstehen können, falls Mutationen in der gDNA auftraten. Auf der Eigenschaft der T7-Endonuklease, diese Heteroduplexe zu schneiden, basierend, wurde der Ansatz mit dem Enzym inkubiert und die entstandenen Banden mittels Gelelektrophorese in einem Ethidiumbromidgel aufgetrennt und unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht. Es wurde immer eine WT-Kontrolle mitgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Experimentelles Setup zur gezielten Induktion chromosomaler Translokationen in *Arabidopsis*

Große chromosomale Umstrukturierungen (*chromosomal rearrangements*, CRs) können auf natürliche Art und Weise entstehen. Sind mehrere Doppelstrangbrüche (DSBs) im Genom vorhanden, können durch fehlerhafte Reparaturmechanismen ursprünglich nicht zusammengehörende Enden illegitim miteinander verknüpft werden. Liegen diese Brüche zum Beispiel auf zwei heterologen Chromosomen vor, können Fragmente dieser ausgetauscht werden und eine Translokation (TL) entsteht. CRs wirken oftmals als Rekombinationshindernis und stehen damit hauptsächlich im Kontext evolutionärer Begriffe wie Spezifikation und Artbildung durch die Ausbildung genetischer Isolation (White, 1978; Livingstone und Rieseberg, 2004). Durch die Reorganisation des Genoms und seiner Struktur tragen CRs jedoch auch zur Erhöhung der genetischen Vielfalt bei (Blanc *et al.*, 2000; Schubert und Vu, 2016). Da der Genpool heutiger Elitesorten durch intensive Züchtungsmethoden stark verkleinert wurde, ist die Einführung neuer genetischer Variationen ein wesentlicher Schritt zur Erzeugung neuer Pflanzen für eine nachhaltige landwirtschaftliche Produktion. Die gezielte Induktion von CRs kann zur Erhöhung dieser Diversität beitragen. Auch die dadurch erreichbare Aufhebung sowie Generierung von Kopplungsgruppen für Merkmale von Interesse stellen wichtige Forschungsfelder in der Pflanzenzüchtung dar.

In dieser Arbeit sollte deshalb ein System zur Sequenz-unabhängigen Induktion chromosomaler Translokationen in *Arabidopsis* etabliert werden. Hierfür wurde das CRISPR/Cas-System mit seiner Eigenschaft des Multiplexing angewendet. Durch die Klonierung zweier für die sgRNAs codierenden Sequenzen in einen pflanzlichen Cas9-Expressionsvektor, können zwei DSBs simultan auf unterschiedlichen Chromosomen induziert werden. Kommt es zum wechselseitigen Austausch der abgetrennten Fragmente durch die Verknüpfung dieser mit dem jeweilig anderen, heterologen Chromosomenarm, bildet sich eine sogenannte reziproke Translokation aus.

3.1.1 Konzeption, Herstellung und Effizienzanalyse der verwendeten Cas9-Nukleasen

Zur Induktion von Translokationen wurde in dieser Arbeit das Cas9-Ortholog aus *Staphylococcus aureus* verwendet, da für diese Nuklease eine hohe Mutageneseeffizienz in Pflanzen demonstriert wurde

3. Ergebnisse

(Steinert *et al.*, 2015). Im hier angewandten konstitutiven Expressionssystem steht die Cas9-Nuklease unter der Kontrolle eines Ubiquitin-Promotors aus *Petroselinum crispum* (*PcUbi4-2*) kombiniert mit einem *pea3A* Terminator aus *Pisum sativum*. Um gleichzeitig zwei DSBs im Genom von *Arabidopsis* zu induzieren, wurde ein Multiplexing-Ansatz gewählt. Hierbei wurden je Ansatz zwei Protospacer mit dem anschließenden PAM 5' -NNGGGT-3' ausgesucht, die etwa im Abstand von 0,5 Mbp zum Telomer des langen Armes von Chromosom 1 (Chr1) und Chromosom 2 (Chr2) liegen. Die induzierten Schnitte wurden in intergenische Bereiche gelegt, um möglichst keine Genfunktion zu beeinflussen. Dadurch sollte eine TL zwischen Chr1 und 2 (TL1-2) erreicht werden (Abbildung 3-1).

Zur Klonierung des Expressionskonstruktes wurden zunächst beide entworfenen *Spacer* als doppelsträngige Oligonukleotide jeweils in einen *Entry*-Vektor pEn-SaChimera eingeführt (Sequenzen der *Spacer* in Tabelle 8-2). Anschließend wurde der erste *Spacer* mit seinem eigenen Promotor und der für die sgRNA codierenden Sequenz in den *Destination*-Vektor pDe-SaCas9 mittels klassischer Klonierung über Restriktionsendonukleasen überführt. Im letzten Schritt folgte das Einfügen der zweiten sgRNA- codierenden Sequenz über eine Gateway®-Reaktion.

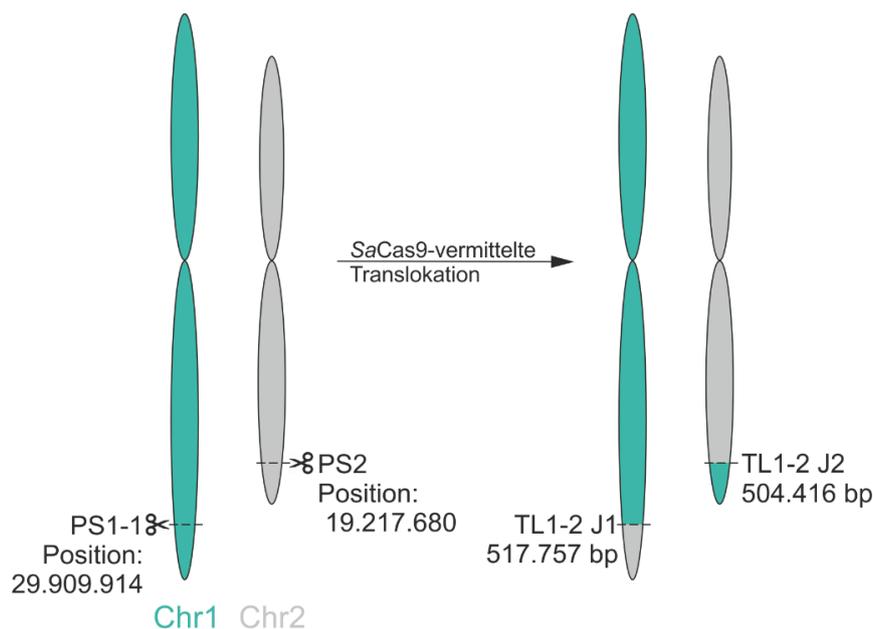


Abbildung 3-1: Schema der gezielten Induktion einer Translokation zwischen Chromosom 1 (Chr1) und Chromosom 2 (Chr2).

Unter Verwendung der Cas9-Nuklease aus *S. aureus* (*SaCas9*) in Kombination mit zwei sgRNAs wurden zwei DSBs an den langen Armen von Chr1 bzw. Chr2 in *Arabidopsis* induziert. Diese Bruchinduktion kann zu einem reziproken Austausch von Fragmenten der Chromosomenarme von etwa 0,5 Mbp führen. Die neuen Verknüpfungspunkte (*Junctions*) der entstandenen TL zwischen Chr1 und Chr2 (TL1-2) werden als J1 bzw. J2 bezeichnet.

Der fertig gestellte Vektor konnte nun über Agrobakterien-vermittelte Transformation mittels *floral dip* in Pflanzen eingebracht und die T-DNA im Pflanzengenom stabil integriert werden (Kapitel 2.2.1.4). Neben der Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps mit dem Ökotyp Col-0 wurden auch Pflanzen der T-DNA Insertionsmutante *ku70-1* transformiert. Diese Mutante ist defekt im c-NHEJ Reparaturweg von DSBs. In Säugerzellen konnte eine Spezies-spezifische sowohl positive wie auch negative Korrelation zwischen diesem Defekt und der TL-Frequenz gezeigt werden (Ghezraoui *et al.*, 2014; Weinstock *et al.*, 2007). Aus dem Transformationsaatgut beider Linien wurden nach zwei Wochen Wachstum auf Selektionsmedium mit Antibiotika jeweils in sechs unabhängigen biologischen Replikaten 100 Primärtransformanden selektiert und gepoolt. Von diesen Pools aus T1-Pflanzen wurde eine qualitativ und quantitativ optimierte DNA-Isolierung durchgeführt (Kapitel 2.2.3.1). Die so gewonnene DNA wurde für nachfolgende Analysen zur Bestimmung der Cas9-Schnitteffizienz sowie der TL-Frequenz und der genaueren Untersuchung der induzierten TL-Ereignisse eingesetzt.

Für die Entstehung von Translokationen ist eine simultane Induktion zweier DSBs notwendig. Je effizienter die Nuklease schneidet, desto wahrscheinlicher ist ein Fragmentaustausch. Deshalb wurde zur vorläufigen Untersuchung der Cas9-Schnitteffizienz ein T7-Endonuklease Assay durchgeführt. Dafür wurden aus jedem DNA-Pool sowie einer nicht-transformierten WT-Kontrolle ca. 1 kb große Fragmente amplifiziert, die den jeweiligen Protospacer umspannen. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden denaturiert und langsam hybridisiert. Ist die Effizienz der Nuklease hoch, sind viele Sequenzen an der Schnittstelle durch eine fehlerhafte Reparatur über den NHEJ-Mechanismus mutiert und es können sich aufgrund der verschiedenen, im Pool vorliegenden Mutationen Heteroduplexe bei der Hybridisierung ausbilden. Diese werden spezifisch von der T7-Endonuklease gebunden und gespalten. Somit kann anhand des Bandenmusters auf einem Gelbild die Effizienz der Bruchinduktion abgeschätzt werden. Je stärker die fragmentierten Banden ausgeprägt sind und je schwächer die unverdaute Bande erscheint, desto effektiver arbeitet die Nuklease. Die Ergebnisse des T7-Endonuklease Assays sind in Abbildung 3-2 dargestellt. Für alle sechs biologischen Replikate im Col-0 sowie im *ku70-1* Hintergrund, die mit den Cas9-Expressionskonstrukten transformiert waren, konnte eine Fragmentierung des PCR-Produktes an beiden Schnittstellen festgestellt werden. In den Ansätzen der *ku70*-Mutante waren die von der T7-Endonuklease unverdauten Banden im Vergleich zu den Col-0 Ansätzen weniger stark ausgeprägt. Die untransformierte WT-Kontrolle (-) zeigte nur eine Bande auf der Höhe des unbehandelten PCR-Produktes. Somit konnte in allen Replikaten für beide Protospacer eine erfolgreiche Bruchinduktion nachgewiesen werden, wobei im *ku70-1* Hintergrund eine höhere Mutageneseeffizienz erreicht wurde. Jedoch kann über diesen Assay nur eine Abschätzung und keine quantitative Aussage über die Effizienz der Nuklease getroffen werden.

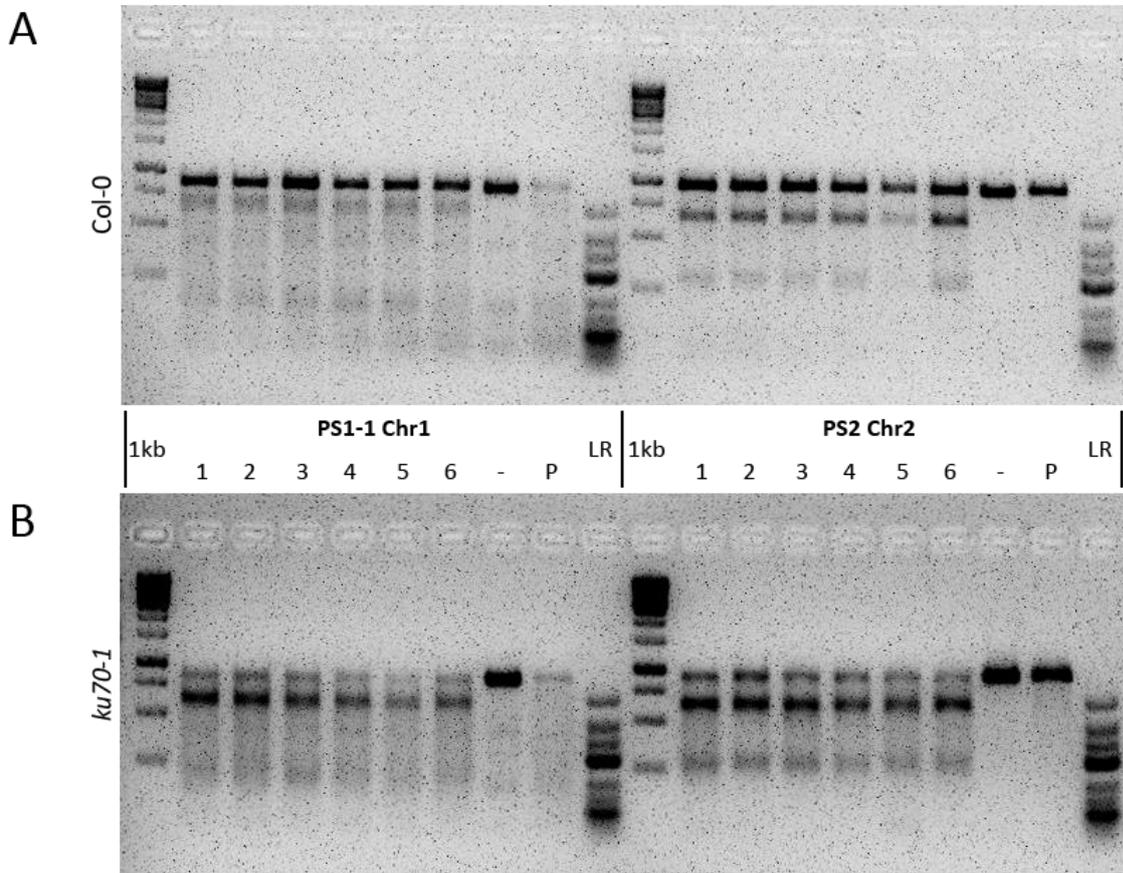


Abbildung 3-2: T7-Endonuklease Assay zur Überprüfung der Schnitteffizienz der *SaCas9*-Nuklease.

Dargestellt sind die Gelbilder der T7-Endonuklease Assays für PS1-1 auf Chr1 (links) und PS2 auf Chr2 (rechts) für jeweils alle sechs Replikate im Col-0 Hintergrund (A) und im *ku70-1* Hintergrund (B). Für alle transformierten Proben konnte eine Fragmentierung des PCR-Produktes beobachtet werden, während die untransformierte Wildtyp-Probe als Negativkontrolle (-) nur eine Bande auf Höhe des unbehandelten PCR-Produktes (P) zeigt. In den *ku70*-Replikaten ist die unverdaute Bande weniger stark, die Banden der verdauten PCR-Produkte jedoch stärker ausgeprägt als in den Col-0 Proben. 1 kb = *GeneRuler*TM 1 kb DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific), LR = *GeneRuler*TM Low Range DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific).

Um die Mutageneseeffizienz zu quantifizieren, wurden Replikat 1 der transformierten Col-0 (Col-0::TL1-2) sowie Replikat 3 der T1-Pflanzen aus der *ku70-1* Linie (*ku70-1*::TL1-2) für eine PCR mit Primern, die mit 6 bp langen *tags* versehen waren, verwendet. Die PCR-Produkte wurden über ein Gel aufgereinigt und vereinigt zur *Next Generation Sequencing* (NGS) Analyse versendet. Nach dem Sortieren anhand der *barcodes* und dem Zusammenfügen der Einzelsequenzen in der CLC Genomics workbench, wurden diese mithilfe des Cas-Analyzer (Park *et al.*, 2017) mit der Referenzsequenz des Wildtypes Col-0 verglichen und analysiert. Die weitere Auswertung der so erhaltenen Sequenzdaten

3. Ergebnisse

erfolgte über R-Studio und Excel. Dabei wurde der Anteil der eine Mutation aufweisenden *reads* an der Gesamtanzahl der *reads* berechnet (Abbildung 3-3). Die so ermittelten Mutageneseeffizienz an Protospacer 1-1 (PS1-1) auf Chr1 beträgt für Col-0 74,8 % und für *ku70-1* 89,6 %. Für Protospacer 2 (PS2) auf Chr2 konnte sogar eine noch höhere Effizienz von 89,7 % im Col-0 Hintergrund erreicht werden. In der *ku70-1* Linie wurde für den zweiten Protospacer eine Mutageneseeffizienz von 97,7 % ermittelt. Die *ku70*-Mutante zeigt somit an beiden Schnittstellen der Cas9-Nuklease eine fast vollständige Veränderung aller untersuchten Sequenzen.

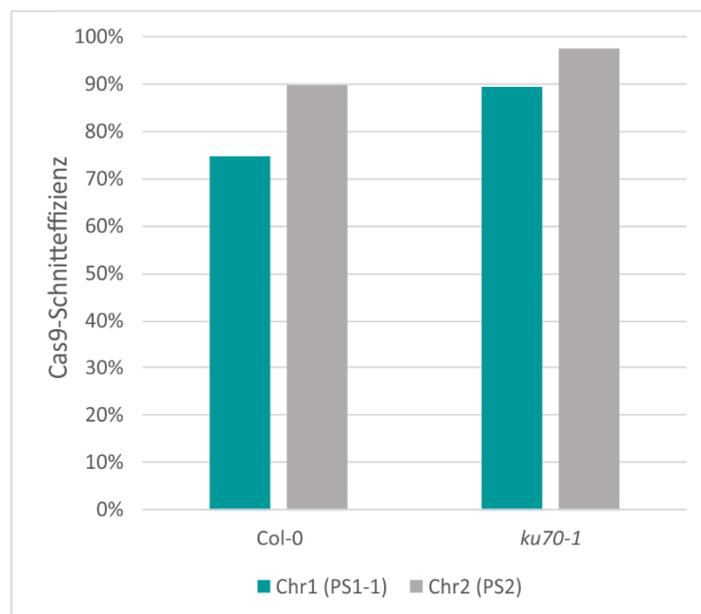


Abbildung 3-3: Cas9-Schnitteffizienz der beiden Protospacer auf Chr1 (PS1-1) und auf Chr2 (PS2).

Die quantitative Analyse der Mutageneseeffizienz des Cas9-Expressionkonstruktes an beiden Schnittstellen mittels *Next Generation Sequencing* ergab Effizienzen von über 70 % sowohl im Col-0 wie auch im *ku70-1* Hintergrund. Dabei konnte in der *ku70*-Mutante allgemein eine höhere Mutageneserate festgestellt werden. In beiden Proben war die Induktion von Mutationen am PS2 effizienter als am PS1-1.

3.1.2 Quantitative Analyse der induzierten Translokationsereignisse

Nach stabiler Transformation von Col-0 WT-Pflanzen und *ku70-1* Mutanten mit dem Cas9-Expressionskonstrukt, der Primärtransformandenselektion und anschließender gDNA-Extraktion, sollten sechs biologische Replikate mit jeweils 100 T1-Pflanzen beider Linien Col-0::TL1-2 und *ku70-1*::TL1-2 auf die Induktion von Translokationen untersucht werden. Da bisherige Studien in *Arabidopsis* das Auftreten von TL nach gezielter DSB-Induktion als äußerst seltenes Ereignis beschreiben

(Peterson *et al.*, 2016), wurde als Methode zur absoluten Quantifizierung der Translokationsereignisse die ddPCR gewählt (siehe Kapitel 462.2.3.2).

Für die Etablierung der PCR-Konditionen wurden zunächst Kontrollplasmide hergestellt (Kapitel 2.2.3.6), die jeweils eine nach der TL entstehende, theoretische *Junction* enthalten. So konnten verschiedene Primer- und Sondenkombinationen getestet werden. Um in einem Reaktionsansatz die Menge der gebildeten TL gleichzeitig mit der Menge der eingesetzten gDNA zu messen, mussten zwei Primerkombinationen für jede *Junction* designt werden. Eine Kombination umspannt jeweils den neu gebildeten Verknüpfungspunkt, die zweite amplifiziert ein Fragment proximal zu diesem auf dem Centromer-ständigen Chromosomenabschnitt (Abbildung 3-4). Hierbei wurde die Verknüpfung des Chr1 als Centromer-ständiger Chromosomenabschnitt mit dem kurzen Stück des Chr2 als *Junction* 1 (J1) bezeichnet, die reziproke Verknüpfung dazu als *Junction* 2 (J2). Die Amplikons in der Nähe der *Junctions* wurden N1 bzw. N2 genannt, entsprechend dem Chromosom, auf dem sie liegen. In den verwendeten Duplex-Ansätzen wurde eine FAM-markierte Sonde zur Detektion der Translokation und eine HEX-markierte Sonde zur Normalisierung auf die Anzahl der Genome verwendet. Die etablierten und schließlich eingesetzten PCR-Konditionen sind Tabelle 8-4 im Anhang zu entnehmen.

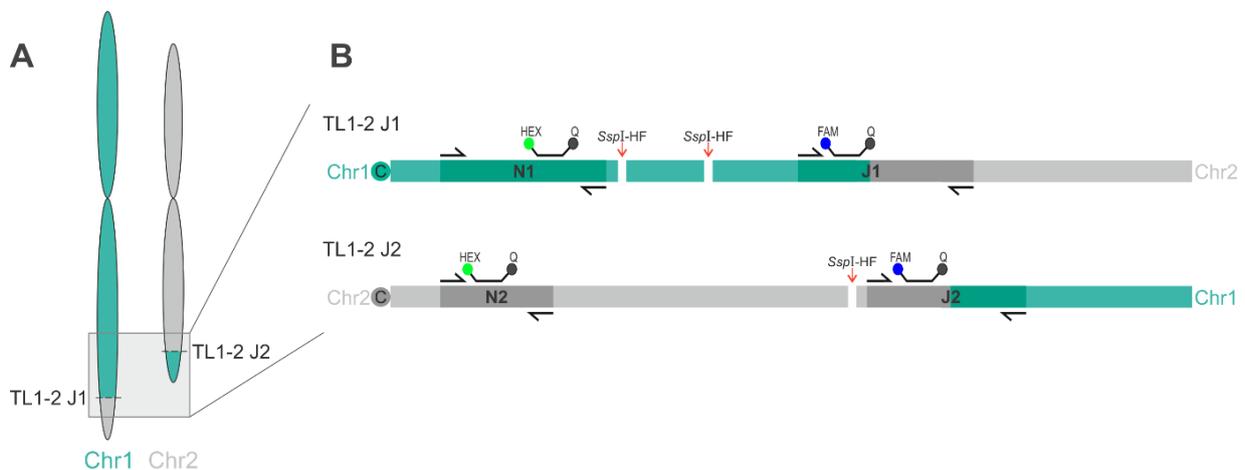


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der quantitativen Analyse der TL-Frequenzen mittels ddPCR.

(A) Kommt es nach DSB-Induktion auf Chr1 und Chr2 zum Austausch der Fragmente entstehen zwei neue *Junctions* (J1 und J2), die die reziproke TL1-2 ausbilden. (B) Diese kann über eine Sonden-basierte ddPCR nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung wurde ein Duplex-Ansatz durchgeführt, der die gleichzeitige Messung der *Junctions* (FAM-markierte Sonde, J1/J2) und der Menge an eingesetzter gDNA zur Normalisierung (HEX-markierte Sonde, N1/N2) ermöglicht. Durch Restriktionsverdau mit *SspI* wurde eine gleichmäßige Verteilung der DNA-Moleküle auf die einzelnen *droplets* und die Vermeidung von PCR-Artefakten gewährleistet.

In Abbildung 3-5 sind die Ergebnisse der ddPCRs für alle Replikate der beiden untersuchten Linien als Boxplots dargestellt. Die Rohdaten der Boxplots sind im Anhang in Tabelle 8-9 zu finden. Zur Berechnung der Werte wurden auch die in der *non-template control* (NTC) als positiv gewerteten *Droplets* mit einbezogen. Zunächst wurden diese Signale in jeweils beiden Kanälen (HEX/FAM) der Kontrollen von denen der untersuchten Proben abgezogen und dann der prozentuale Anteil an TL-Ereignissen (FAM-Kanal) zur eingesetzten Genomanzahl (HEX-Kanal) bestimmt. In allen untersuchten Replikaten konnte die erfolgreiche Induktion von TL-Ereignissen nachgewiesen werden. In der T1-Generation von Col-0 Pflanzen lagen die TL-Frequenzen der einzelnen Replikate zwischen 0,003 % und 0,013 % für J1 und zwischen 0,0005 % und 0,021 % für J2. Der daraus resultierende Mittelwert liegt für beide *Junctions* bei etwa 0,01 %, d.h. ein Ereignis unter 10.000 resultierte in einer TL. Interessanterweise wurden im *ku70-1* Hintergrund durchschnittliche TL-Frequenzen von circa 0,05 % an beiden *Junctions* ermittelt. Dies entspricht einer signifikanten Erhöhung der TL-Frequenz in der Mutante im Vergleich zum WT an beiden *Junctions*. Dabei konnte im Allgemeinen eine größere Streuung der Werte für die einzelnen biologischen Replikate als im WT dokumentiert werden. Diese lagen zwischen 0,02 % und 0,15 %.

3.1.3 Qualitative Analyse der induzierten Translokationsereignisse

In Säugern gibt es Spezies-spezifische Unterschiede, wie TL entstehen (Brunet und Jasin, 2018). Die untersuchten *Junctions* weisen auf die Beteiligung eines der beiden NHEJ Reparaturwege hin. Da für die in dieser Arbeit induzierte TL zwischen Chr1 und Chr2 kein homologes Template zur Verfügung steht, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass eine TL über einen NHEJ-basierten Reparaturweg vermittelt wird. Um herauszufinden, welcher Mechanismus tatsächlich in Pflanzen der Bildung von TL zugrunde liegt, wurden die Verknüpfungspunkte der induzierten TL genauer analysiert. Hierbei ist es besonders interessant, den Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *ku70-*Mutante zu untersuchen. Das KU70-Protein ist ein Schlüsselprotein des c-NHEJ Reparaturweges. Es bindet im Heterodimer mit KU80 die Bruchenden und rekrutiert nachfolgend wichtige Faktoren der c-NHEJ (Fell und Schild-Poulter, 2015). Somit unterdrückt KU70 die Reparatur eines DSBs mittels anderer Mechanismen. In somatischen Pflanzenzellen ist die KU-vermittelte Reparatur der Hauptmechanismus in der DSB-Reparatur. Die T-DNA Insertionsmutante *ku70-1* zeigt daher Hypersensitivitäten gegenüber DSB-induzierenden Agenzien und eine Verschiebung des Reparaturmusters hin zu einem alternativen Weg des alt-NHEJ mit der Verwendung von MHs in der Nähe der Bruchstelle (Tamura *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2013b; Shen *et al.*, 2017a).

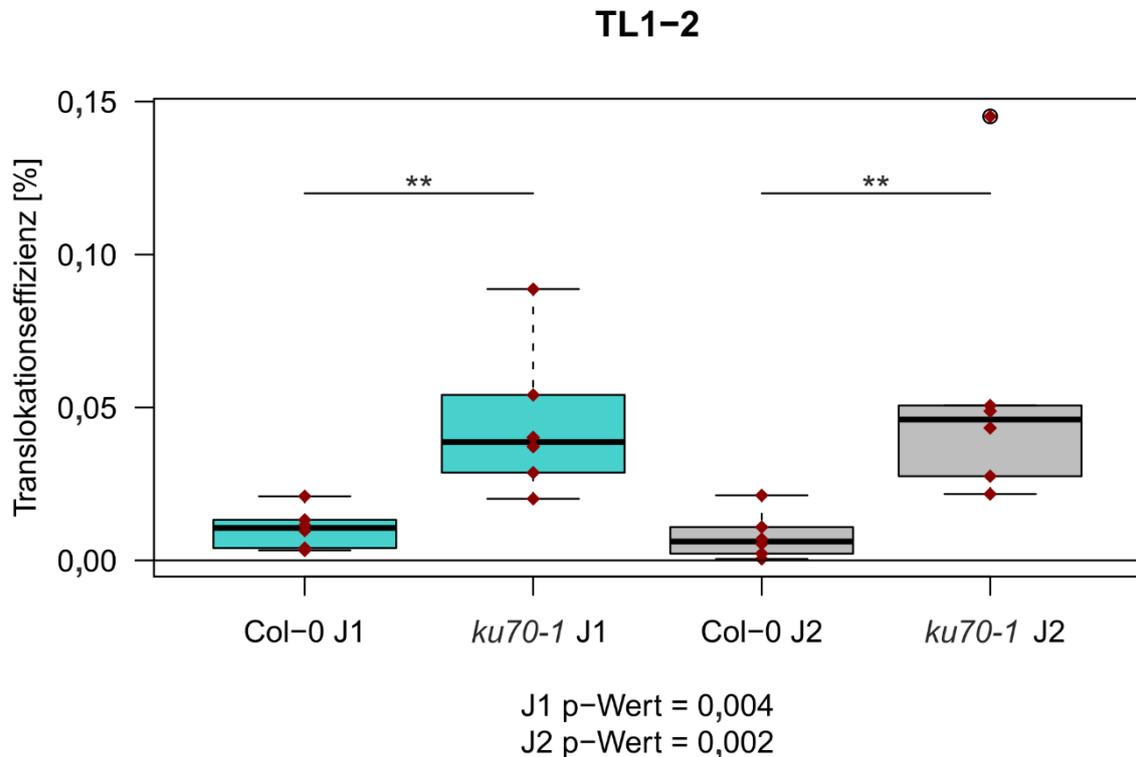


Abbildung 3-5: Quantitative Analyse der TL-Frequenz.

Zur Quantifizierung von TL-Ereignissen im Col-0 und im *ku70-1* Hintergrund wurden mittels ddPCR je sechs unabhängige biologische Replikate mit je 100 unabhängigen T1-Pflanzen analysiert ($n=6$). Dabei wurde der prozentuale Anteil an TL relativ zur eingesetzten Genomanzahl berechnet und als Boxplot dargestellt. Aufgezeichnet ist der Median, der Interquartilbereich vom ersten bis zum dritten Quartil (Box), sowie die äußeren 50 % der Daten als Antennen und Ausreißer. Die roten Punkte bezeichnen die einzelnen Werte der biologischen Replikate. Innerhalb des Wildtyps wie auch der *ku70* Mutante sind die Mediane für jeweils J1 als auch J2 auf etwa der gleichen Höhe. Im Allgemeinen streuen die Daten stärker nach oben, wobei für *ku70-1* J2 eine Probe (0,145 %) als Ausreißer gewertet wurde. Für *ku70-1* konnte für beide TL-Junctions eine signifikante Erhöhung der Frequenzen im Vergleich zum WT gezeigt werden. Signifikanzlevel wurden über den Mann-Whitney-U-Test berechnet (p-Wert $< 0,01$ **).

Für die detaillierte Untersuchung der TL-Junctions wurde eine *deep sequencing* Analyse durchgeführt. Zunächst wurden sowohl für Col-0 wie auch *ku70-1* die Verknüpfungspunkte mit Sequenz-spezifischen Primern mit vorgegebenen Überhängen amplifiziert und zum NGS versendet. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzierdaten erfolgte über den Cas-Analyzer (Park *et al.*, 2017), gefolgt von R-Studio und Excel. Im Cas-Analyzer wurden die erhaltenen *reads* mit der Referenzsequenz verglichen. Die Referenzsequenz entspricht einer fehlerfreien Translokation. Diese liegt vor, wenn nach Induktion der beiden DSBs die abgetrennten Fragmente der beiden Chromosomenarme 3 bp *upstream* der PAMs ohne

weitere Mutationen jeweils am anderen Chromosom ligieren. Die *reads* wurden anhand dieses Vergleiches in vier verschiedene Klassen aufgeteilt. Unterschied sich die Sequenz nicht von der Referenz, wurde dieses Ereignis als fehlerfreie Ligation bezeichnet. Fehlten Basen im Bereich der *Junction*, wurden diese den Deletionen zugeordnet. Traten zusätzliche Basenpaare an den Verknüpfungspunkten auf, wurden diese *reads* als Insertion klassifiziert. Kombinationen aus Deletionen und Insertionen wurden als Indels bezeichnet.

In Abbildung 3-6 sind die Ergebnisse der NGS Analysen beider *Junctions* J1 und J2, sowohl im Col-0 als auch im *ku70-1* Hintergrund dargestellt, die dazugehörigen Rohdaten in Tabelle 8-10, Tabelle 8-11 und Tabelle 8-12 im Anhang. Für die Analyse der *Junction* J2 standen aufgrund einer Poly(T)-Sequenz von 20 Nukleotiden im Amplikon (Referenzsequenz im Anhang Kapitel 8.2.2) im Vergleich zur J1 sehr viel weniger *reads* zur Verfügung.

Im Col-0 Hintergrund zeigte die Mehrheit der analysierten *reads* an beiden *Junctions* eine fehlerfreie Ligation (Abbildung 3-6 A). Dies entspricht etwa 60 % der *reads* an J1, sowie ca. 50 % an J2. Die *ku70-*Mutante hingegen zeigte an beiden *Junctions* ein gegensätzliches Muster zum Wildtyp. Sowohl an J1 wie auch J2 konnten fast keine *reads* der fehlerfreien Ligation zugeschrieben werden. Über 99 % der analysierten Ereignisse trug eine Veränderung der Basenfolge im Vergleich zur Referenzsequenz (Abbildung 3-6 B). Zusätzlich zur Einteilung der Ereignisse in die verschiedenen Klassen, wurde die Klasse der Deletionen näher untersucht. Hierbei wurde nach der Länge des Verlustes an Basenpaaren unterschieden und die *reads* in drei Klassen eingeteilt: klein (1-10 bp), mittel (11-50 bp) und groß (> 50 bp). Im Wildtyp kann der größte Anteil der vorgefundenen Deletionen als klein (1-10 bp) oder mittel (11-50 bp) bezeichnet werden, wohingegen im *ku70-1* Hintergrund im Vergleich zum WT an beiden *Junctions* mehr *reads* Deletionen von größerer Länge zugeordnet werden konnten (Abbildung 3-6 C). Auch die Größe der Insertionen, meistens verknüpft mit einer Deletion, lag in der *ku70-*Mutante vergleichsweise höher (Anhang Tabelle 8-12). Zusammenfassend traten in der c-NHEJ Mutante mehr und größere Mutationen auf. Diese Daten legen nahe, dass in der *ku70-1* Mutante tatsächlich die alt-NHEJ an der Verknüpfung der Chromosomenfragmente bei einer TL-*Junction* beteiligt ist. Da in der alt-NHEJ zur Verknüpfung der Bruchenden oftmals MHs herangezogen werden (Schimmel *et al.*, 2017), wurden die NGS Daten nach dem Vorhandensein von MH an den *Junctions* untersucht (Abbildung 3-6 D). Hierbei zeigten im Wildtyp die meisten *reads* eine Ligation ohne Nutzung von MHs an beiden Verknüpfungspunkten. Im Vergleich dazu zeigte der Großteil der *reads* aus der analysierten *ku70-*Mutante an J1 eine Verknüpfung mithilfe von MHs, bei J2 waren etwa die Hälfte über MH verknüpft worden. Damit trat ein mit MHs assoziiertes Reparaturmuster sieben bis 22-mal so oft in *ku70-1* als im WT auf.

3. Ergebnisse

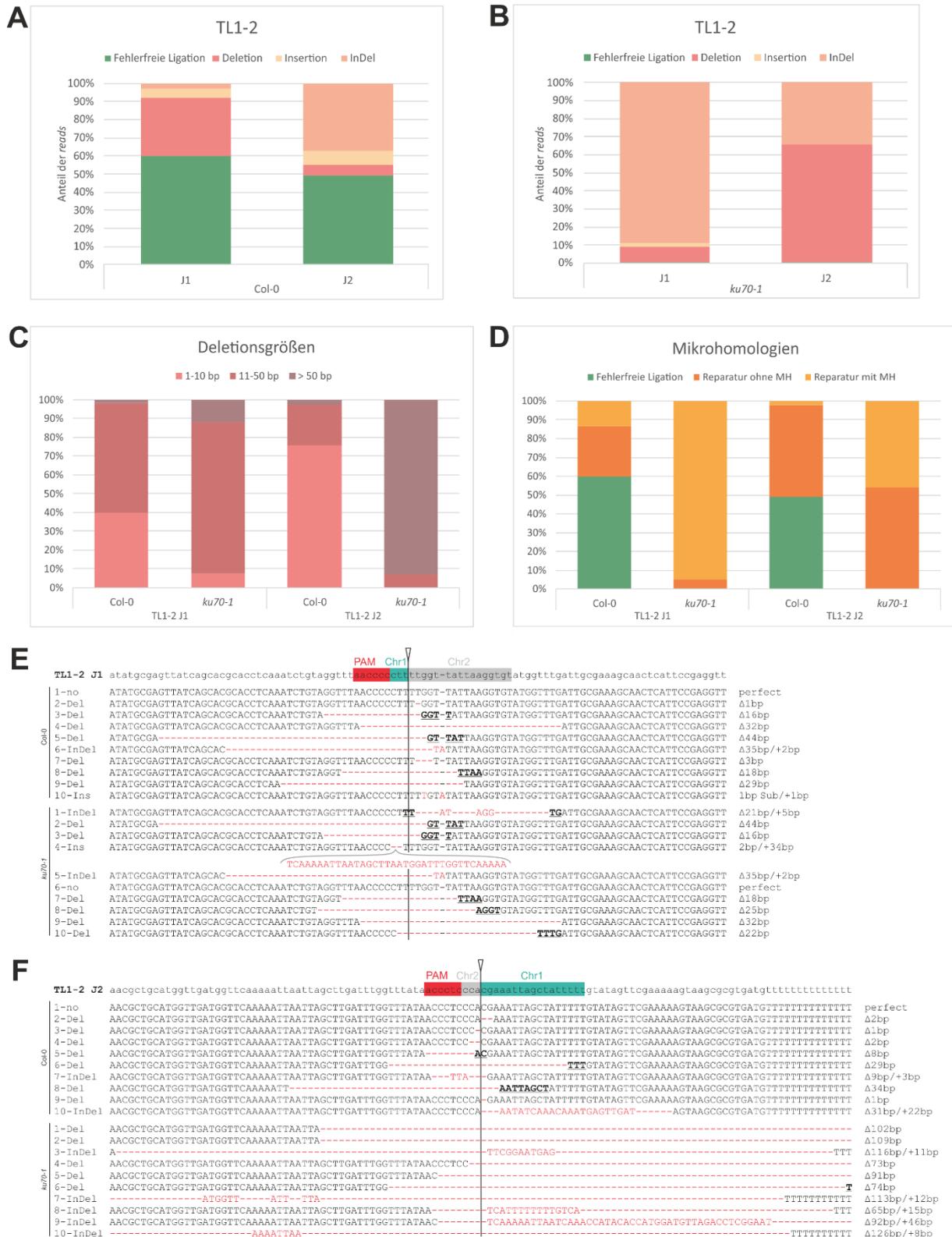


Abbildung 3-6: Detaillierte Analyse der NGS-Daten bezüglich des Reparaturmusters an den Junctions von TL1-2 in der T1-Generation.

3. Ergebnisse

Fortsetzung Abbildung 3-6: (A+B) Die *Deep sequencing* Analyse der TL-*Junctions* des Wildtyps ergab, dass rund 50-60 % der beiden neuen Verknüpfungspunkte im Wildtyp-Hintergrund fehlerfrei ligiert wurden. In der *ku70*-Mutante enthielten fast alle *reads* der analysierten *Junctions* Mutationen, hauptsächlich Deletionen oder Indels. **(C)** Auswertung der NGS-Daten zu den Deletionen an den Verknüpfungspunkten. Hier wurden nur die eine Deletion beinhaltenden *reads* analysiert. Die Länge der Deletionen wurde in drei Klassen unterteilt (klein: 1-10 bp, mittel: 11-50 bp, groß:> 50 bp). Die Deletionen an den *Junctions* in Col-0 waren größtenteils klein oder mittelgroß, wohingegen die *ku70*-Mutante an beiden *Junctions* eine größere Menge großer Deletionen aufwies. **(D)** Quantifizierung des Auftretens von Mikrohomologien (MHs), die für die *Junction*-Bildung verwendet wurden. Die *reads* wurden in drei Klassen unterteilt: fehlerfrei ligierte *Junctions* (grün), *Junctions*, die ohne Verwendung von MHs (orange) oder mithilfe von MHs (gelb) gebildet wurden. Im Wildtyp wurden die meisten *Junctions* direkt ohne Mutationsinduktion an den Bruchpunkten ligiert. Von den *reads*, die Mutationen an den *Junctions* zeigten, wurden die meisten ohne die Verwendung von MHs verbunden, nur eine Minderheit wurde unter Verwendung von MHs ligiert. Im Gegensatz dazu trat im *ku70*-Mutantenhintergrund fast keine fehlerfreie Ligation auf und das vorherrschende Reparaturmuster an den Verbindungsstellen zeigte die Verwendung von MHs zur Ligation. **(E+F)** Detaillierte Darstellung der zehn häufigsten *reads* beider Verknüpfungspunkte auf Sequenzebene im Wildtyp sowie von *ku70-1*. In Rot dargestellt sind die an den *Junctions* aufgetretenen Mutationen, fett markiert wurden die für eine Reparatur verwendeten MHs an den neuen Verknüpfungspunkten.

Zusätzlich wurden die zehn am häufigsten vorgefundenen *Junction*-Sequenzen beider Verknüpfungspunkte in beiden Linien auf Sequenzebene dargestellt (Abbildung 3-6 E+F). Diese Auflistung zeigt deutlich, dass das Reparaturmuster im Wildtyp keine oder kleine Mutationen an den Bruchstellen beinhaltet und nur selten MHs auftreten. In der Mutante hingegen sind die Mutationen größer und öfter in Verbindung mit MHs an den Verknüpfungspunkten assoziiert. Besonders an J2 zeigen die meisten *reads* im *ku70-1* Hintergrund Deletionen von über 100 bp.

3.2 Gezielte Induktion vererbbarer Translokationen durch Eizell-spezifische Cas9-Expression und Etablierung einer homozygoten TL-Linie

Nach erfolgreichem Nachweis der Induktion von Translokationsereignissen in *Arabidopsis* mittels des CRISPR/Cas-Systems sollten im Rahmen dieser Arbeit Linien etabliert werden, welche eine TL homozygot tragen. Dazu sollte eine effiziente Weitergabe der induzierten TL an die nächste Generation erfolgen. Im Rahmen der bisherigen Analysen konnte nicht nur eine effiziente Induktion von TL-Ereignissen gezeigt, sondern auch eine Erhöhung der TL-Frequenz in der *ku70-1* Mutante erzielt werden. Jedoch wurde neben der erhöhten Anzahl an Ereignissen auch eine erhöhte Mutageneserate an den TL-*Junctions* festgestellt. Für die praktische Anwendung ist eine präzise Induktion einer TL ohne die weitere Veränderung der Sequenzinformation an den Verknüpfungspunkten wünschenswert. Deshalb wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten zur Etablierung von TL-Ereignissen der Fokus auf den Wildtyp gelegt.

3.2.1 Konzeption und Herstellung der Eizell-spezifischen Cas9-Nukleasen

Zur gezielten Induktion von vererbbaaren TLs wurde die Expression der Cas9-Nuklease unter die Kontrolle eines Eizell-spezifischen Promotors gestellt. Durch die Expression von Cas9 in diesen frühen Entwicklungsstadien, können die gewünschten Ereignisse schon in der Eizelle entstehen und nachfolgend auf die gesamte, sich hieraus entwickelnde Pflanze übertragen werden. In *Arabidopsis* wurde dieser gewebespezifische EC1.1/EC1.2-Promotor (Fusion des EC1.2 *enhancer* mit dem EC1.1 Promotor) bereits effizient für die Cas9-Expression eingesetzt, um vererbbaare Mutationen und *gene targeting* Ereignisse zu erzeugen (Wang *et al.*, 2015; Wolter *et al.*, 2018). Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Expressionskonstrukte, wurde über klassische Klonierung im pDe-*SaCas9* (Steinert *et al.*, 2015) der Promotor und der Terminator für die Cas9-Nuklease ausgetauscht (Abbildung 3-7). Da in der ursprünglichen Sequenz dieses Plasmids neben der den Promotor flankierenden *EcoRI*-Schnittstelle noch eine weitere Schnittstelle vorhanden ist, wurde ein Vektor mit stiller Mutation an dieser Stelle verwendet (Angelina Schindele, persönliche Kommunikation). So konnte zunächst über einen *SacI*-Verdau der *pea3A* Terminator gegen den *rbcS-E9* Terminator ausgetauscht werden, bevor mittels eines erneuten Restriktionsverdau mit *EcoRI* der ursprüngliche PcUbi4-2 Promotor gegen den EC1.1/EC1.2-Promotor getauscht wurde. In den so entstandenen *Destination*-Vektor pDe-*SaCas9*-ECP (ebenfalls verwendet in Wolter *et al.*, 2018) wurden die beiden *sgRNA*-Kassetten aus den *Entry*-Vektoren zur Bruchinduktion auf Chr1 sowie Chr2 (Kapitel 3.1.1, Tabelle 8-2 und 8-8 im Anhang) eingefügt.

3. Ergebnisse

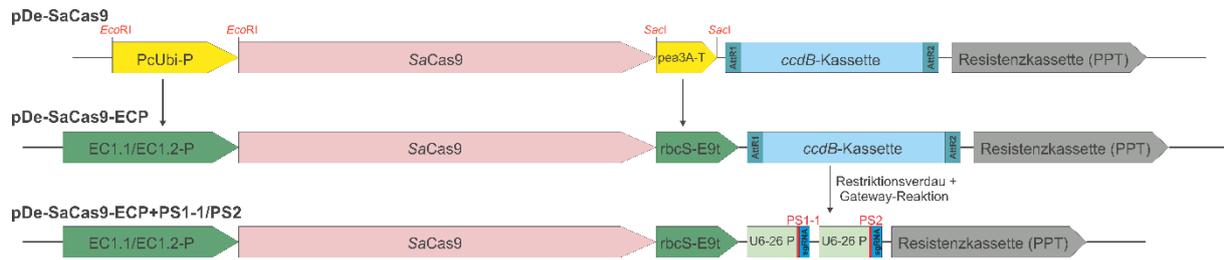


Abbildung 3-7: Klonierung des verwendeten Expressionsvektors pDe-SaCas9-ECP mit PS1-1 und PS2.

Nach dem Austausch des Promotors und Terminators des pDe-SaCas9 (gelb) über Restriktionsverdau gegen den Promotor EC1.1/EC1.2-P (grün) und den rbcS-E9t Terminator (grün) wurden die beiden sgRNA-Kassetten (U6-26-P+PS+sgRNA) in den *Destination*-Vektor pDe-SaCas9-ECP eingefügt.

3.2.2 Etablierung von TL1-2 homozygot tragenden Pflanzenlinien

Für die Etablierung von Pflanzenlinien, die die reziproke TL zwischen Chr1 und Chr2 homozygot tragen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt (Abbildung 3-8). Dieses ermöglicht die effiziente Identifizierung solcher Linien, die ein seltenes Ereignis tragen.

3.2.2.1 Analyse von TL-Ereignissen in der T2-Generation

Im ersten Schritt wurde das *multiplexing* Konstrukt pDe-SaCas9-EC+PS1-1/PS2 mittels Agrobakterienvermittelter *floral-dip* Transformation in Wildtyp-Pflanzen des Ökotyps Col-0 sowie die T-DNA Insertionsmutante *ku70-1* eingebracht. Mittels des Eizell-spezifischen Ansatzes können durch die transiente Expression der Cas9-Nuklease in den Keimzellen der T0-Pflanzen schon vor Integration der T-DNA DSBs induziert werden und theoretisch eine TL entstehen. Jedoch wirkt sich die stabile Integration der T-DNA positiv auf die Expression aus und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer TL wird erhöht. Deshalb wurde das Transformationsaatgut auf Selektionsmedium ausgebracht, je Linie 40 Primärtransformanden zur Vermehrung per Selbstung im Gewächshaus angezogen und erst die T2-Generation anschließend auf die Induktion der TL untersucht.

Die resultierenden T2-Linien wurden mittels PCR-basierter Genotypisierung hinsichtlich des Auftretens beider TL-*Junctions* gescreent. Es wurden insgesamt 80 T2-Pflanzen aus jeder unabhängigen Transformationslinie in zwei Pools analysiert. Dazu wurde für einen Pool Blattmaterial von 40 Pflanzen abgenommen und die DNA gesammelt isoliert. In der anschließenden PCR-basierten Genotypisierung wurden die Proben mittels spezifischer Primer auf das Auftreten der TL-*Junctions* untersucht. Hier konnten positive Signale für 3 von 40 T2-Linien für die TL zwischen Chr1 und Chr2 ermittelt werden.

3. Ergebnisse

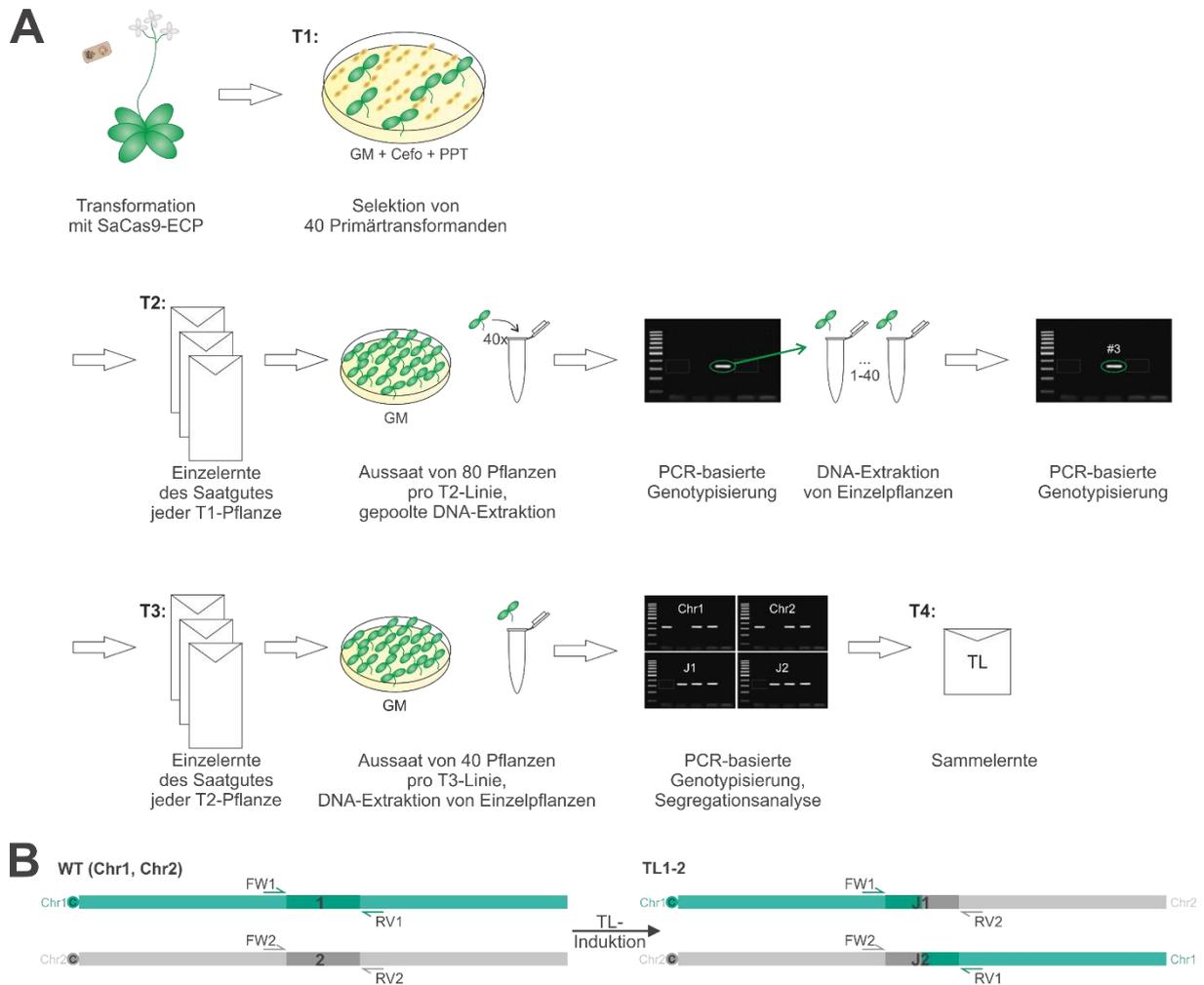


Abbildung 3-8: Etablierung von Linien homozygot für die TL1-2.

(A) Flussdiagramm des Protokolls für die CRISPR/Cas-vermittelte TL-Induktion in *Arabidopsis*. Nach Agrobakterium-vermittelter Transformation mit *SaCas9* unter Eizell-spezifischer Expressionskontrolle werden Primärtransformanten selektiert. Translokationsereignisse können in den Eizellen dieser T1-Pflanzen induziert werden und die Nachkommen der jeweiligen Pflanzen werden in Pools auf die neu gebildeten *Junctions* untersucht. Einzelpflanzen der positiven Pools werden dann durch PCR-basiertes Screening auf TL-Induktion überprüft. Diese Pflanzen, die die TL reziprok tragen, werden vermehrt und für die TL homozygote Pflanzen können in der nächsten Generation identifiziert und anschließend weitervermehrt werden. (B) Für ein PCR-basiertes Screening wurden zwei Primerkombinationen entworfen, die die Regionen über den beiden induzierten DSB auf den verschiedenen Chromosomen überspannen. Durch Kombination des *Forward*-Primers auf Chromosom 1 (FW1) mit dem *Reverse*-Primer auf Chromosom 2 (RV2) kann die TL-*Junction* TL1-2 J1 nachgewiesen werden. TL1-2 J2 kann respektive unter Verwendung der Primer FW2 bzw. RV1 nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

In der *ku70*-Mutantenlinie wurden 4 von 20 T2-Linien positiv auf die reziproke TL1-2 getestet. Aus Blattmaterial jeder Einzelpflanze der entsprechenden positiven Linie wurde die gDNA extrahiert und erneut mittels PCR-basierter Genotypisierung auf die TL getestet. In jeder Linie konnte so mindestens eine Pflanze mit beiden TL-*Junctions* bestätigt werden, was zu TL-Frequenzen von bis zu 2,5 % in einzelnen Linien für den WT und 3,75 % für die *ku70*-Mutante führte. Insgesamt wurden so für TL1-2 vier Einzelpflanzen im Col-0 Hintergrund und acht Einzelpflanzen im *ku70-1* Hintergrund isoliert (Tabelle 3-1). Diese Ergebnisse entsprechen jeweils einer aus 800 bzw. einer aus 200 analysierten Pflanzen mit einem vererbaren Ereignis. Dieses Verhältnis stimmt auch mit der Analyse der TL-Frequenzen mittels der ddPCR in der T1-Generation überein (Kapitel 3.1.2).

Tabelle 3-1: Analyse vererbbarer Translokationen in der T2-Generation.

Aufgeführt sind die Ergebnisse der PCR-basierten Genotypisierung für die mit den EC-spezifischen Konstrukten transformierten Ansätze im Col-0 und im *ku70-1* Hintergrund. Für Col-0 konnten drei aus 40 T2-Linien mit insgesamt vier Einzelpflanzen als positiv identifiziert werden, was eine TL-Frequenz von 0,125 % ergibt. Für *ku70-1* konnten in nur 20 T2-Linien vier positive Linien mit insgesamt acht Einzelpflanzen gefunden werden, somit lag die TL-Frequenz bei 0,5 %.

T1-Linie	Positive T2-Linien pro analysierten Linien	Detailliert analysierte T2-Linien	Positive Einzelpflanzen	T2-Effizienz	Positive Einzelpflanzen gesamt	TL-Frequenz in der T2
Col-0:: EC-TL1-2	3/40	NBE605 #5	1	1,25 %	4	0,125 %
		NBE605 #7	1	1,25 %		
		NBE605 #25	2	2,5 %		
<i>ku70-1</i> :: EC-TL1-2	4/20	NBE606 #1	1	1,25 %	8	0,5 %
		NBE606 #7	3	3,75 %		
		NBE606 #11	1	1,25 %		
		NBE606 #12	3	3,75 %		

3.2.2.2 Analyse der Segregation bezüglich der TL in der T3-Generation

Alle vier in der T2-Generation als TL tragend identifizierte Col-0-Pflanzen sowie zwei der *ku70*-Mutanten, die die TL1-2 tragen, wurden durch Selbstung vermehrt und ihre Nachkommen wurden mittels PCR auf Segregation bezüglich der TL-*Junctions* überprüft. Dazu wurden von je 40 Pflanzen Blattmaterial abgenommen und die DNA extrahiert. Jede so gewonnene gDNA wurde mittels vier PCRs daraufhin untersucht, ob die korrespondierende Pflanze die TL homozygot reziprok, heterozygot reziprok, nur an einem Verknüpfungspunkt oder gar nicht trägt (Kapitel 2.2.3.2, Abbildung 3-8 B).

3. Ergebnisse

Die positiven T2-Pflanzen sollten in ihrem diploiden Chromosomensatz sowohl zwei WT-Chromosomen wie auch die chimären Kopien der jeweiligen Chromosomen tragen (Abbildung 3-9 A). Daher sollten aus den vier Keimzellen dieser Pflanzen eine die WT-Version der Chr1 und Chr2 und eine die chimären Chromosomen tragen, während die andere Hälfte der Gameten genetisch insofern unausgewogen sein sollte, als dass diese zwei Kopien eines der beiden translozierten Chromosomenarme, aber keine des anderen tragen (Abbildung 3-9 B). Wenn alle Gameten in der Lage wären, ihre genetische Information auf die Nachkommen zu übertragen, würden in zwei von 16 Fällen diploide Zygoten entstehen, denen ein Teil eines Chromosomenarms fehlt. Darüber hinaus würden in acht weiteren Fällen diploide Zygoten auftreten, die eine unausgewogene Anzahl von Chromosomenarmen tragen, und nur sechs Kombinationen würden zu einer ausgewogenen diploiden Nachkommenschaft führen. Das in der Theorie erwartete Ergebnis für die Segregation, das zu neun verschiedenen Kombinationen unter den vier zur Analyse durchgeführten PCR-Assays führt, ist in Abbildung 3-9 C dargestellt. In der Tat konnten im Gegensatz zu den formalen Erwartungen nur die drei ausgeglichenen Genotypen (homozygote WT, heterozygote TL, homozygote TL; Tabelle 3-2) für die analysierten Col-0::TL1-2 Linien beobachtet werden. Anstatt des erwarteten Anteils von einer aus 16 diploiden Zygoten für Homozygotie bezüglich der TL (Abbildung 3-9 C), traten solche Pflanzen in 20 - 30 % der Fälle in der nächsten Generation auf. Dies deutet darauf hin, dass nur genetisch ausgewogene Gameten zur Keimbahn beitragen können. In einer solchen Situation würde ein 1:2:1-Segregationsmuster zwischen homozygoten WT-, heterozygoten TL- und homozygoten TL-Pflanzen erwartet werden. Um auf dieses 1:2:1-Segregationsverhältnis zu testen, wurden die erhaltenen Daten aus der PCR-basierten Genotypisierung statistisch mittels des χ^2 -Tests analysiert (Tabelle 3-2). Es konnte für alle untersuchten T3-Linien im Col-0 Hintergrund eine 1:2:1-Aufspaltung bestätigt werden. Gleiches gilt für die TL-Linien der *ku70*-Mutanten, hier waren 17,5 % bis 30 % der Nachkommen homozygot für die Translokation mit dem gleichen Segregationsmuster wie im Wildtyp. Alle Pflanzen, die in der PCR-basierten Genotypisierung homozygot für die TL1-2 getestet wurden, wurden im Gewächshaus zur Vermehrung bis zur Samenreife gezogen und die resultierende T4-Generation weiteren Analysen unterzogen.

3. Ergebnisse

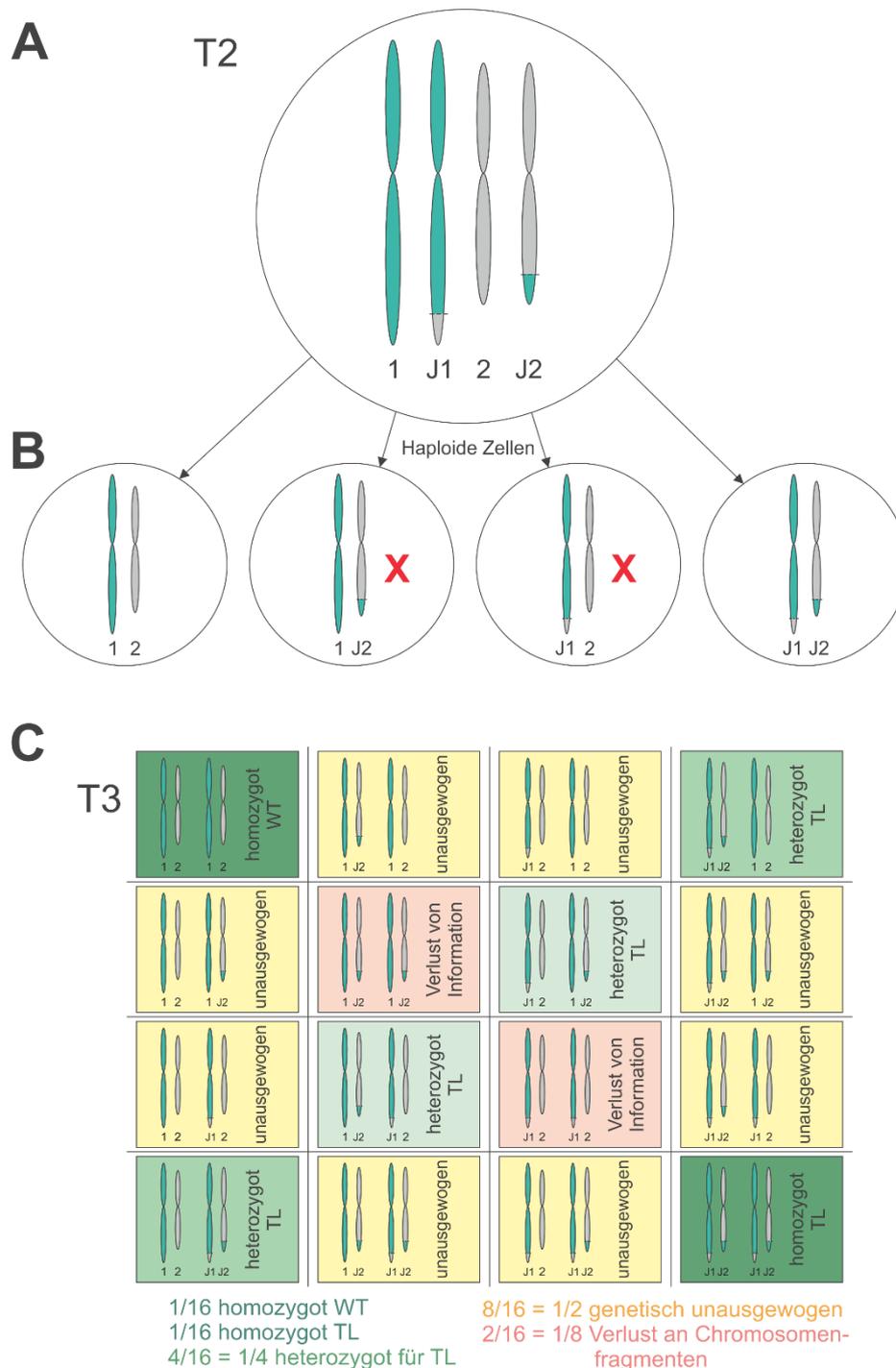


Abbildung 3-9: Schematisches Segregationsmuster einer reziproken Translokation in ihrem hemizygoten Zustand.

(A) Chromosomensätze der T2-Pflanzen beherbergen sowohl WT (1 + 2) als auch die chimären Kopien der jeweiligen Chromosomen (J1 + J2). (B) Ihre Gameten tragen daher entweder den haploiden Chromosomensatz mit WT-Chromosomen, den Satz mit der reziproken Translokation oder einen von zwei möglichen Sätzen von Chromosomen, denen ein Teil der genetischen Information fehlt (rotes Kreuz). (C) In der T3-Generation können theoretisch 16 genotypische Kombinationen entstehen, wenn alle vier Gameten gleichmäßig auf die nächste

3. Ergebnisse

Fortsetzung Abbildung 3-9: Generation übertragen würden. Die Hälfte der Fertilisationsereignisse würde jedoch zu unausgewogenen Chromosomensätzen führen (8, gelb), zwei Möglichkeiten würden zum Verlust genetischer Informationen führen (rot) und nur sechs Kombinationen (grün) führen zu einer ausgeglichenen diploiden Nachkommenschaft. Von diesen sechs ausgewogenen Genotypen sind vier für die TL heterozygot, was bedeutet, dass sie beide Chromosomen in ihrer ursprünglichen und ihrer umstrukturierten Konfiguration tragen. Zwei von ihnen würden aus unsymmetrischen (hellgrün) und zwei aus ausgeglichenen Gameten (dunkelgrün) entstehen. Wenn also die unausgeglichenen Gameten (markiert mit rotem Kreuz) nicht zur Nachkommenschaft beitragen könnten, würden statt der 16 möglichen nur vier lebensfähige Zygoten (1x homozygote WT, 2x heterozygote TL, 1x homozygote TL) erzeugt, was zu einer 1:2:1 Segregation der translozierten Chromosomen führen würde.

Tabelle 3-2: Segregationsanalyse der T3-Linien.

Von jeder T3-Linie wurden 40 Pflanzen mittels PCR auf ihren Genotyp untersucht. Dabei konnten nur die drei Genotypen homozygot WT, heterozygot TL, und homozygot TL festgestellt werden. Alle Linien wurden mit dem χ^2 -Test auf Segregation nach Mendel getestet und für alle konnte eine positive Korrelation ($\chi^2 < 3,84$) gezeigt werden.

T3-Linie		Anzahl getesteter Pflanzen	Homozygot WT	Heterozygot TL	Homozygot TL	Unausgewogener Genotyp	χ^2	1:2:1 Segregation
Col-0:: EC-TL1-2	NBE657#24	40	9	23	8	0	0.950	Ja
			22,5 %	57,5 %	20,0 %			
	NBE658#6	40	10	18	12	0	0.600	Ja
			25,0 %	45,0 %	30,0 %			
	NBE669#30	40	8	21	11	0	0.550	Ja
			20,2 %	52,5 %	27,5 %			
	NBE669#38	40	12	20	8	0	0.800	Ja
			30,0 %	50,0 %	20,0 %			
ku70-1:: EC-TL1-2	NBE660#11	40	13	15	12	0	2.550	Ja
			32,5 %	37,5 %	30,0 %			
	NBE715#9	40	8	25	7	0	2.550	Ja
			20,0 %	62,5 %	17,5 %			

3.2.2.3 Analyse der für die TL1-2 homozygoten Linien

Alle Pflanzen, die für die TL als homozygot identifiziert wurden, wurden vermehrt und analysiert, um die molekulare Natur der TLs zu charakterisieren. Zunächst wurden die *Junctions* J1 und J2 der TL1-2 mittels PCR amplifiziert und das PCR-Produkt mittels der Sanger-Methode sequenziert (siehe Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.5). Die Ergebnisse dieser Sequenzierung sind in Abbildung 3-10 dargestellt. Eine

3. Ergebnisse

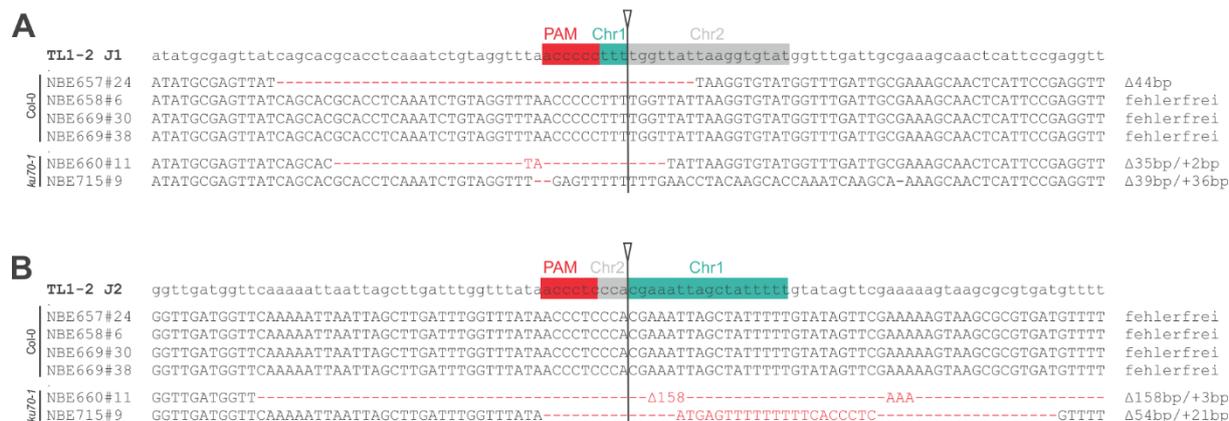


Abbildung 3-10: Sequenzierungsergebnisse beider Junctions der vererbaren Translokationsereignisse.

(A) Drei von vier T4-Linien im Wildtyp-Hintergrund zeigen an J1 eine fehlerfreie Ligation, die vierte Linie weist eine kurze Deletion von 44 bp ($\Delta 44$ bp) auf. Beide analysierten TL-Linien im *ku70-1* Hintergrund tragen Mutationen mit dem für die Reparatur über alt-NHEJ charakteristischen Muster an J1 (B) wie auch an J2. Die TL-tragenden Col-0 Pflanzen haben alle vier eine J2 ohne Sequenzverlust.

perfekte Ligation ohne Sequenzänderung an beiden Verknüpfungspunkten konnte für drei (#6, 30 und 38) der vier Col-0 Linien mit TL1-2 dokumentiert werden. Die vierte Linie (#24) zeigte eine Deletion von 44 bp an J1, aber eine perfekt ligierte J2. Wie erwartet zeigten die beiden untersuchten TL-tragenden *ku70*-Mutantenlinien alle größere Indels, die Reparaturmuster-Charakteristik von alt-NHEJ. Um nachzuweisen, dass keine Sequenzinformation verloren ging, wurden zusätzlich im Abstand von jeweils 100 kb über die gesamte Länge der translozierten Chromosomenabschnitte repräsentative Fragmente von etwa 2,5 kb für die homozygoten Linien #24 und #30, die die Deletion an J1 und die fehlerfrei ligierten Junctions für TL1-2 trugen, erfolgreich amplifiziert (Abbildung 3-11 A+B, Primerkombinationen Anhang Tabelle 8-6).

Neben der molekularen Analyse der TL sollten die TL-tragenden Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen untersucht werden. Dazu wurden alle zu vergleichenden Linien unter gleichen Bedingungen im Gewächshaus angezogen und nach 5 Wochen Wuchszeit der Phänotyp verglichen. Hier konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Linien im WT-Hintergrund festgestellt werden (Abbildung 3-11 C). Zusätzlich wurden von jeweils fünf Pflanzen einer Linie je fünf Schoten abgenommen und deren Länge vermessen sowie die Anzahl der enthaltenen Samen ausgezählt. In dieser Fertilitätsanalyse konnte im Vergleich zum Wildtyp keine eingeschränkte Fruchtbarkeit der TL-Linien festgestellt werden (Abbildung 3-11 D+E). Darüber hinaus wurden Rückkreuzungsanalysen durchgeführt, um zu untersuchen, ob die eingeführte TL Einschränkungen auf die Hybridisierung mit dem Wildtyp hat.

3. Ergebnisse

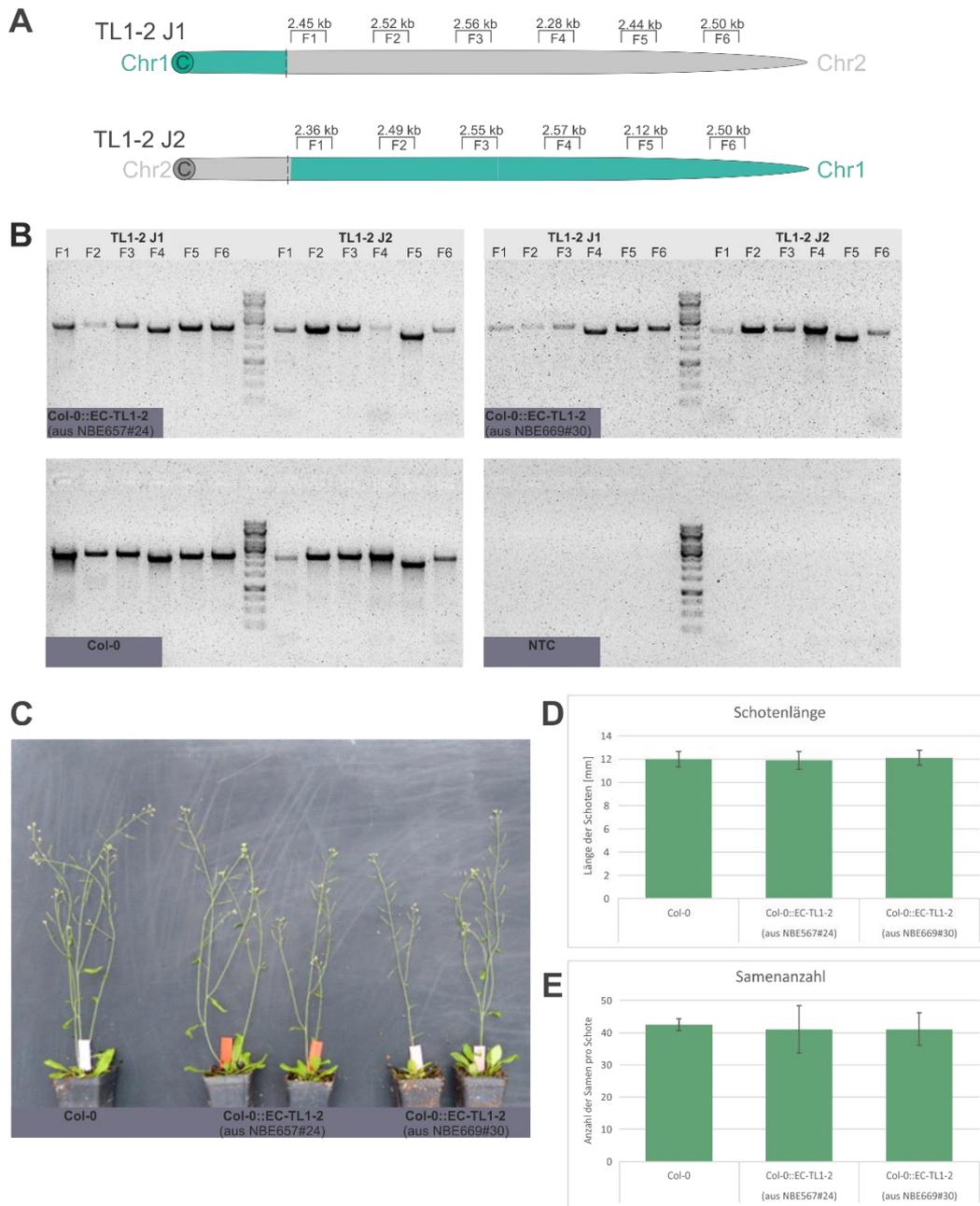


Abbildung 3-11: Molekulare und phänotypische Analyse von Pflanzen, die die TL1-2 homozygot tragen.

(A) Schematische Darstellung der amplifizierten Fragmente auf den translozierten Bereichen in für die TL homzygoten Pflanzen. (B) Gelelektrophorese von PCR-Amplikons der translozierten Chromosomenfragmente. Im Abstand von 100 kb konnte auf den translozierten Chromosomen jeweils eine Bande nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass während der Ausbildung der TL keine Information verloren ging. Als PCR-Kontrollen wurden gDNA des Wildtyps ohne TL-Bildung (Col-0) und Wasser (NTC = *Non Template Control*) verwendet. (C) Der phänotypische Vergleich von fünf Wochen alten Pflanzen zeigte keine Unterschiede im Wachstum zwischen dem Wildtyp und den Pflanzen, die die TL1-2 homozygot trugen. (D+E) Die Fertilitätsanalyse wurde durchgeführt, indem die Länge der Schoten gemessen und die Anzahl der Samen gezählt wurden. Für beide analysierten Linien mit der TL1-2 konnte kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden.

3. Ergebnisse

Sowohl mit der TL1-2 Linie als Mutter- wie auch als Vaterpflanze wurden Schoten mit Samen erhalten und die F1-Generation zeigte eine Einkreuzung des Genmaterials der jeweiligen Vaterpflanze. Nach Vermehrung des Saatgutes wurde die F2-Generation auf Segregation bezüglich der *TL-Junctions* untersucht. Es wurde wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben eine PCR-basierte Genotypisierung beider Kreuzungslinien durchgeführt. Auch hier wären in der Theorie, wie in Abbildung 3-9 aufgezeigt, aus vier Keimzellen die Bildung von 16 unterschiedlichen Kombinationen möglich. Jedoch konnten hier ebenfalls wie in der T3-Generation nur ausbalancierte Genotypen unter den Nachkommen identifiziert werden (Tabelle 3-3). Deren Segregation folgt den Mendel'schen Regeln, mit der Annahme, dass genetisch unausgeglichene Gameten nicht zur Vermehrung beitragen. Zusätzlich wurden durch die Rückkreuzung mit dem transgenfreien Wildtyp Pflanzen erhalten, die die TL1-2 homozygot und kein Cas9-Protein mehr im Genom tragen.

Tabelle 3-3: Segregationsanalyse der F2-Linien nach Rückkreuzung.

Von beiden F2-Linien wurden 40 Pflanzen mittels PCR auf ihren Genotyp untersucht. Dabei konnten nur die drei Genotypen homozygot WT, heterozygot TL, und homozygot TL festgestellt werden. Beide Linien wurden mit dem χ^2 -Test auf Segregation nach Mendel getestet und für alle konnte eine positive Korrelation ($\chi^2 < 3,84$) gezeigt werden.

F2-Linie	Anzahl getesteter Pflanzen	Homozygot WT	Heterozygot TL	Homozygot TL	Unausgewogener Genotyp	χ^2	Mendel'sche (1:2:1) Segregation
Col-0 ♀ x Col-0::EC-TL1-2 ♂	40	11 27,5 %	21 52,5 %	8 20,0 %	0	0.550	Ja
Col-0::EC-TL1-2 ♀ x Col-0 ♂	40	10 25,0 %	24 60,0 %	6 15,0 %	0	2.400	Ja

3.2.3 Etablierung von TL1-5 homozygot tragenden Pflanzenlinien

Um zu demonstrieren, dass die Induktion von vererbaren Translokationen weder orts- noch sequenzabhängig ist, wurde ein weiterer Ansatz designt. Hier sollte ein Austausch von Fragmenten der langen Chromosomenarme von Chr1 und Chr5 induziert werden. Dazu wurden zwei neue Protospacer ausgewählt, PS1-2, unweit des Protospacers PS1-1 aus dem ersten Ansatz auf Chr1, und PS5, etwa ein Mbp entfernt zum Telomer von Chr5 liegend (Abbildung 3-12, Sequenzen im Anhang Tabelle 8-2). Zur Klonierung der Expressionskonstrukte wurden die komplementären *spacer* in den *Entry*-Vektor pEn-*Sa*Chimera eingefügt und anschließend wie in Kapitel 2.2.3.6 beschrieben beide sgRNA-Kassetten in den pDe-*Sa*Cas9 bzw. den pDe-*Sa*Cas9-ECP (Kapitel 3.2.1) überführt. So sollte es

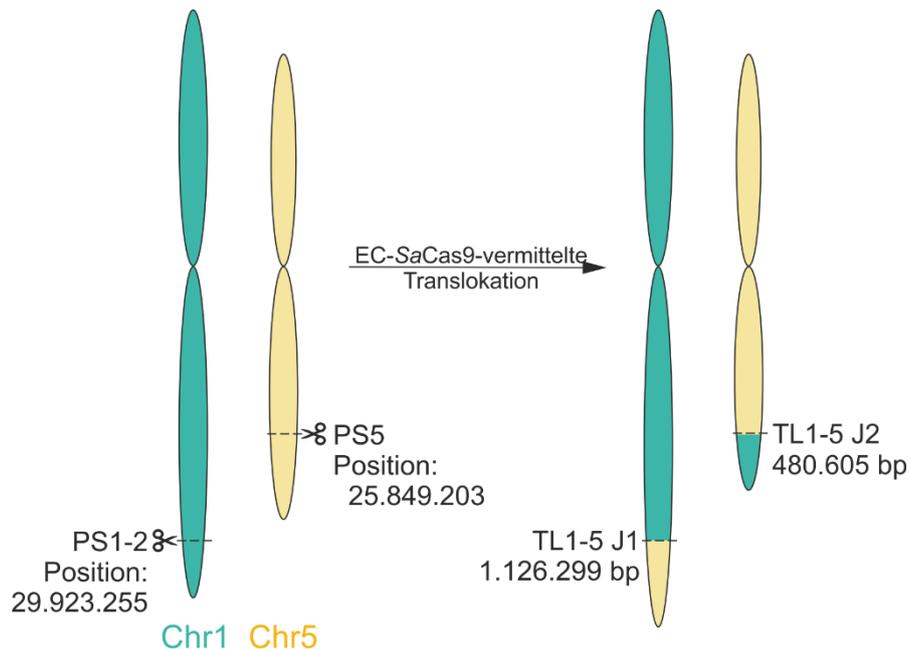


Abbildung 3-12: Schema der Induktion von Translokationen zwischen Chromosom 1 und 5 (TL1-5).

Über eine Eizell-spezifische Expression von *SaCas9* werden zwei DSBs auf den jeweiligen Chromosomen eingeführt und ein Austausch von Fragmenten im Mbp-Bereich erreicht. Die neuen Verknüpfungspunkte (*Junctions*) der entstandenen TL1-5 werden als J1 bzw. J2 bezeichnet.

durch die Expression der Nuklease unter Kontrolle einmal eines ubiquitären Promotors und einmal eines Eizell-spezifischen Promotors zur simultanen Induktion zweier DSBs kommen, die zur Ausbildung einer TL zwischen Chr1 und Chr5 (TL1-5) führen kann.

Für die *ku70*-Mutantenlinie konnte im ersten Ansatz zwar eine höhere Induktionseffizienz von TLs erreicht werden, jedoch wurde keine fehlerfreie Ligation der Bruchenden festgestellt. Dieser Verlust bzw. Insertion von Sequenzinformationen ist für die praktische Anwendung in der Züchtung nicht wünschenswert. Zusätzlich zeigen *ku70*-Mutanten bei einer Vermehrung über mehrere Generationen eine Instabilität auf (Kazda *et al.*, 2012). Darum wurden die CRISPR-Konstrukte in diesem Fall nur in den Col-0 Hintergrund transformiert. Die Selektion von stabil transformierten Pflanzen erfolgte über eine Aussaat auf Phosphinotricin-haltigem Medium.

Primärtransformanden, die das Konstrukt mit der Nuklease unter Kontrolle des Ubi-Promotors in ihr Genom integriert hatten, wurden für die Untersuchung der Cas9-Schnitteffizienz verwendet. In diesem Fall konnte für die qualitative Analyse der Schnittinduktion an beiden Protospacern der CAPS-Marker Assay herangezogen werden (Kapitel 2.2.3.7). Kommt es nach der DSB-Induktion 3 bp *upstream* des PAM zur Ausbildung von Mutationen an dieser Stelle, wird die dort vorhandene Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym verändert. Über einen Restriktionsverdau kann deshalb nachgewiesen

3. Ergebnisse

werden, ob es zur Mutagenese kam. Dazu wurde zunächst ein 1 kb-Fragment über PS1-2 und ein 700 bp langes Fragment über PS5 amplifiziert und anschließend über Nacht verdaut. Für PS1-2 wurde das Restriktionsenzym *HpaI*, für PS5 *SspI* verwendet. Bei unvollständigem Verdau der PCR-Amplikons wurden Mutationen an der Restriktionsschnittstelle induziert. Je stärker die Bande dieses unverdauten Produktes, desto höher die Effizienz der Nuklease. Die Ergebnisse des CAPS-Marker Assays sind in Abbildung 3-13 A dargestellt. An PS1-2 sind für alle sechs untersuchten biologischen Replikate bestehend aus jeweils 100 Primärtransformanten eine deutliche Bande auf Höhe des unverdauten PCR-Produktes und schwache Banden für die verdauten Fragmente auf dem Gelbild zu erkennen. Für PS5 ergibt sich ein genau umgekehrtes Bild. Hier sind die unverdauten Banden nur schwach vorhanden, während eine größere Menge des PCR-Produktes verdaut wurde. Als Kontrolle wurde eine untransformierte Col-0 Probe eingesetzt, die eine vollständige Fragmentierung aufzeigt. Um einen Vergleich mit der Schnitteffizienz der Nuklease zur Induktion der TL1-2 und quantifizierbare Daten zu erhalten, wurde auch hier mit einem Replikat ein NGS durchgeführt (Kapitel 2.2.3.5). Nach Amplifikation über die Protospacer mit Primern, die mit 6 bp langen *tags* versehen waren, wurden die PCR-Produkte über ein Gel aufgereinigt und vereinigt zur NGS Analyse versendet. Nach dem Sortieren

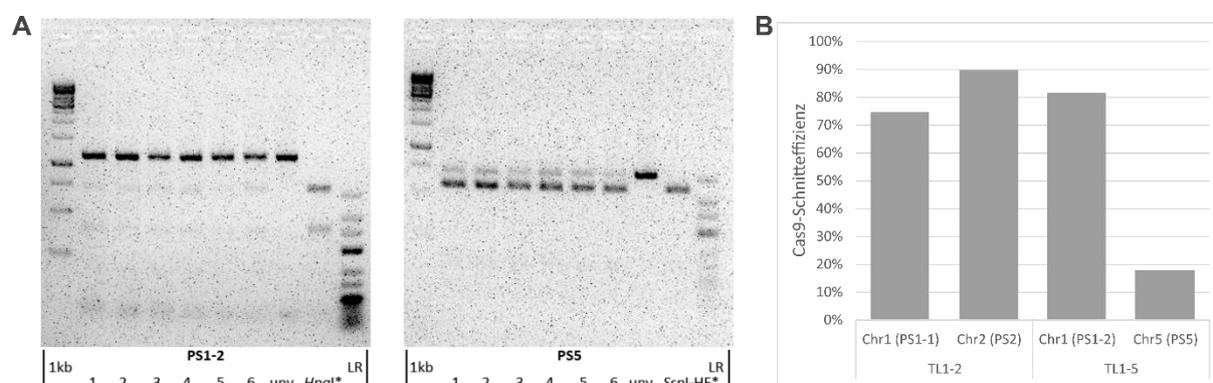


Abbildung 3-13: Analyse der Cas9-Schnitteffizienz.

(A) Dargestellt sind die Gelbilder des CAPS-Marker Restriktionsverdau für PS1-2 auf Chr1 (links) und PS5 auf Chr5 (rechts) für sechs Replikate im Col-0 Hintergrund. Für alle transformierten Proben konnten Banden auf Höhe des unverdauten PCR-Produktes (unv.) beobachtet werden. An PS1-2 sind diese stärker ausgeprägt als an PS5. Die Kontrolle des Restriktionsverdau mit dem jeweiligen Enzym (*) zeigte in beiden Ansätzen eine vollständige Fragmentierung. (B) Die quantitative Analyse der Mutageneseeffizienz mittels NGS ergab für den Protospacer auf Chr1 (PS1-2) eine vergleichbare Effizienz von ca. 80 % zu dem Ansatz TL1-2. Für den Protospacer auf Chr5 (PS5) konnte eine geringe Mutageneserate von nur etwa 20 % ermittelt werden. 1 kb = *GeneRuler*TM 1 kb DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific), LR = *GeneRuler*TM Low Range DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific).

3. Ergebnisse

anhand der *barcodes* und dem Zusammenfügen der Einzelsequenzen in der CLC Genomics workbench, wurden die erhaltenen Sequenzdaten mithilfe des Cas-Analyzer (Park *et al.*, 2017) mit der Referenzsequenz des Wildtypes Col-0 verglichen und analysiert. Die anschließende Auswertung erfolgte über R-Studio und Excel. Dabei wurde der Anteil der eine Mutation aufweisenden *reads* an der Gesamtanzahl der *reads* berechnet (Abbildung 3-13 B). An PS1-2 konnte eine hohe Schnitteffizienz der Cas9-Nuklease mit 81 % bestätigt werden. Dies entspricht in etwa den Frequenzen an den Protospacern zur TL-Induktion zwischen Chr1 und Chr2. Die Induktion von Mutationen an PS5 hingegen ist sehr niedrig. Hier zeigten nur 18 % der analysierten *reads* eine Veränderung der Sequenz im Vergleich zum WT.

Zur Etablierung einer Linie, die die TL1-5 homozygot trägt, wurden 40 Primärtransformanten aus der Transformation mit dem pDe-*SaCas9-EC+PS1-2/PS5* mittels Selbstung vermehrt. Da die Expression der Cas9-Nuklease unter der Kontrolle des EC-spezifischen Promotors steht, wird in diesem Ansatz die Analyse nicht schon in der T1-Generation durchgeführt. Die nachfolgende Analyse in der Folgegeneration ausgehend von den 40 unabhängigen T2-Linien erfolgte mittels PCR-basiertem Screening. Dieses Screening auf die TL1-5 tragenden Pflanzen wurde nach dem erfolgreich etablierten Protokoll durchgeführt, das in Kapitel 3.2.2 beschrieben und in Abbildung 3-8 dargestellt ist. Die Analyse von 40 T2-Linien wies nur eine positive Linie auf, in der unter den 80 gescreenten Pflanzen nur eine Einzelpflanze (#12) ein positives Ergebnis für beide *Junctions* der TL1-5 in den PCR zeigte (Tabelle 3-4). Diese wurde durch Selbstung vermehrt und die gewonnenen Samen in der T3-Generation mittels PCR-basierter Genotypisierung untersucht. Die für dieses Screening verwendeten Primer sind im Anhang Tabelle 8-5 zu finden. Hierbei wurden über 40 % Wildtyp, d. h. die TL1-5 nicht tragende, und fast 50 % für die TL heterozygote Pflanzen erhalten. Nachkommen, die die TL homozygot tragen, wurden mit einer Rate von 10 % festgestellt (Tabelle 3-4). Letztere wurden vermehrt, um die bezüglich der TL1-5 homozygote Linie genauer zu analysieren.

Für die molekulare Analyse der *Junctions* J1 und J2 der TL1-5 wurden diese mit spezifischen Primern in einer PCR amplifiziert und mit Sanger-Sequenzierung auf Sequenzebene untersucht. Die Untersuchung der neuen Verknüpfungspunkte dieser Linie ergab kleine Deletionen für J1 von einem und für J2 von 12 Nukleotiden (Abbildung 3-14 A). Auch für diese TL sollte überprüft werden, ob die gesamten Abschnitte der Chromosomenarme ausgetauscht wurden oder ob ein Teil der Sequenzinformation verloren ging. Dafür wurden in 100 kb Abständen Fragmente auf den translozierten Bereichen amplifiziert. Im Gesamten ergab dies 12 PCR-Produkte für TL1-5 J1 auf Chr5 und sechs Amplifikate für den translozierten Teil von Chr1 an TL1-5 J2 (Anhang Tabelle 8-6). In Abbildung 3-14 B sind die Gelbilder mit der erfolgreichen Amplifikation aller Fragmente auf beiden translozierten Bereichen der

3. Ergebnisse

TL-tragenden Pflanze sowie der untransformierten Col-0 als Positivkontrolle und eine Wasser-Kontrolle dargestellt.

Tabelle 3-4: Etablierung der TL1-5 homozygoten Linie.

Durch PCR-basierte Genotypisierung konnte in der T2-Generation eine für die TL1-5 positive Pflanze identifiziert werden, die in der nächsten Generation 10 % homozygote Nachkommen produzierte.

T1-Linie	Positive T2-Linien pro analysierten Linien	Detailliert analysierte T2-Linien		Positive Einzelpflanzen	TL-Frequenz in der T2
Col-0::EC-TL1-5	1/40	NBE668 #1		1	0,031 %

T3-Linie	Anzahl getesteter Pflanzen	Homozygot WT	Heterozygot TL	Homozygot TL	Unausgewogener Genotyp
NBE730#12	40	17 42,5 %	19 47,5 %	4 10,0 %	0

Zusätzlich wurden der Phänotyp und die Fertilität der für TL1-5 homozygot etablierten Linie mit dem untransformierten WT (Col-0) verglichen (Abbildung 3-15). Dazu wurden beide Linien unter gleichen Bedingungen im Gewächshaus angezogen. Die TL-Linie ist in ihrem Wuchs vergleichbar zum Wildtyp. Zusätzlich wurden von jeweils fünf Pflanzen einer Linie je fünf Schoten abgenommen und deren Länge vermessen sowie die Anzahl der enthaltenen Samen ausgezählt. In dieser Fertilitätsanalyse zeigt die homozygote Linie etwas längere Schoten wie auch eine geringfügig höhere Anzahl an Samen als der WT. Damit konnte gezeigt werden, dass die TL1-5 tragende Linie mindestens genauso fertil wie der Wildtyp ist.

3. Ergebnisse

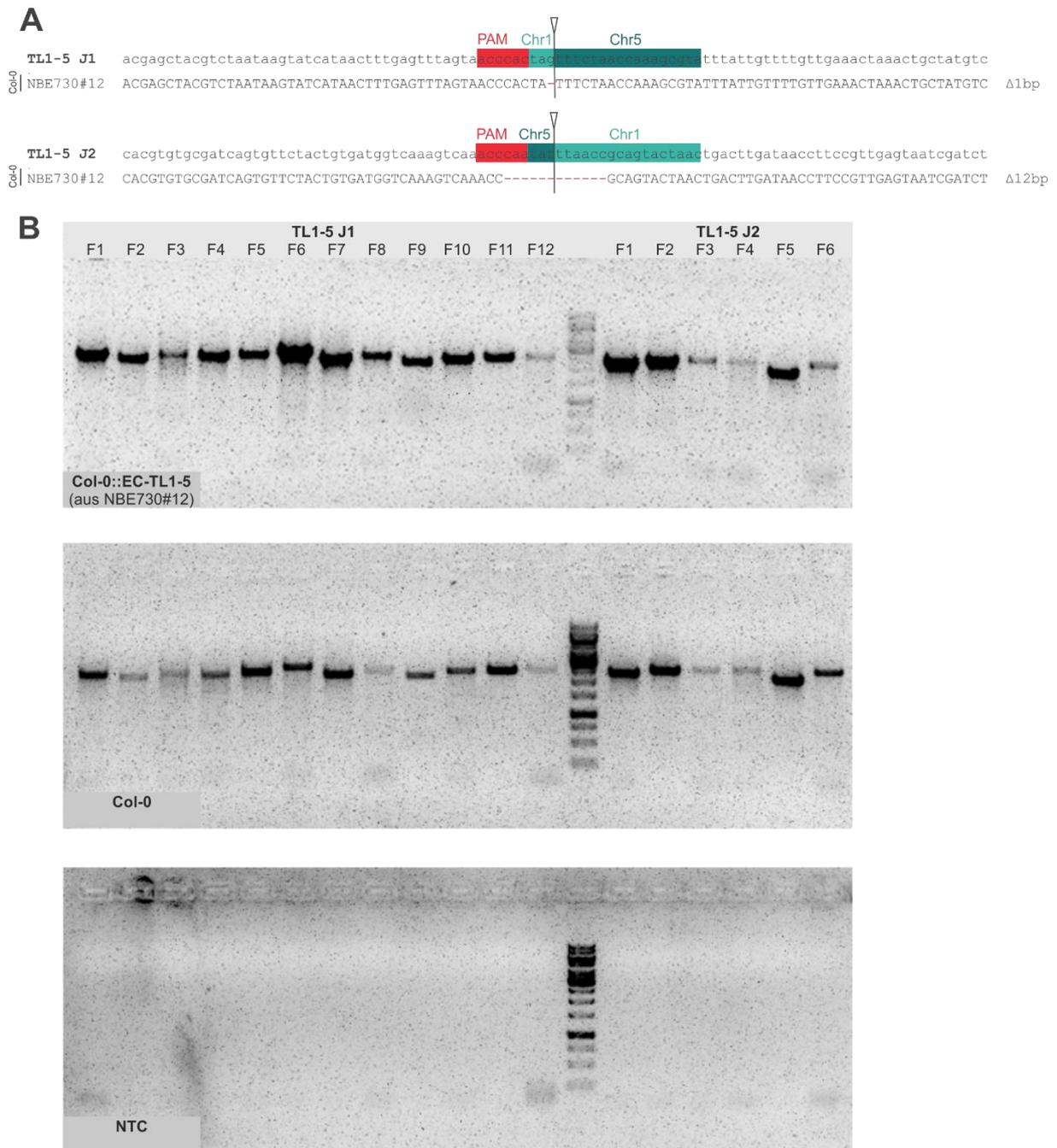


Abbildung 3-14: Molekulare Analyse der für die TL1-5 homozygoten Pflanze.

Sanger-Sequenzierung der *Junctions* J1 und J2. An beiden neuen Verknüpfungspunkten tritt eine kleine Deletion von 1 bp bzw. 12 bp auf. **(B)** Gelelektrophorese von PCR-Amplikons der translozierten Chromosomenfragmente der TL1-5. Im Abstand von 100 kb konnte eine Bande auf den translozierten Bereiche nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass während der Ausbildung der TL keine Information verloren ging. Als PCR-Kontrollen wurden gDNA des Wildtyps ohne TL-Bildung (Col-0) und Wasser (NTC = *Non Template Control*) verwendet.

3. Ergebnisse

Zusammengefasst konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass mithilfe der Eizell-spezifischen Expression der Cas9-Nuklease aus *S. aureus* erfolgreich Translokationen induziert werden können, deren Vererbung an die nächste Generation erfolgt. Dabei wurden in der T2-Generation TL-Frequenzen bis zu 2,5 % in einzelnen Linien für den WT und 3,75 % für die *ku70*-Mutante erreicht. Durch ein effizientes *Screening*-Protokoll konnten für beide induzierten Translokationen, TL1-2 und TL1-5, homozygote Linien etabliert werden. Diese zeigten im Col-0 Hintergrund im Bereich der *Junctions* keine Sequenzverluste oder nur kleine Deletionen. Zusätzlich konnte die Sequenzierung der neuen Verknüpfungsstellen einen konservativen und reziproken Austausch der Chromosomenarme bestätigen. Darüber hinaus konnten keine ersichtlichen Unterschiede im Phänotyp und keine reduzierte Fertilität für die etablierten Linien im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden.



Abbildung 3-15: Phänotyp- und Fertilitätsanalyse von für TL1-5 homozygoten Pflanzen.

(A) Im Vergleich zum Wildtyp (Col-0) zeigt die TL-Linie Col-0::EC-TL1-5 einen mindestens vergleichbar guten Wuchs. (B+C) Bei der Messung der Schotenlänge und der Samenanzahl wurde für die TL tragende Linie eine geringe, jedoch signifikante Erhöhung der Fertilität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Signifikanzlevel wurden über einen zweiseitigen *t*-Test mit unterschiedlicher Varianz berechnet (p-Wert < 0,01 **; p-Wert < 0,001 ***).

3.3 Analyse der Einzelstrangbruch-induzierten Homologen Rekombination

In der Grünen Biotechnologie werden gezielt DSBs im Pflanzengenom eingeführt, um Veränderungen an der Zielsequenz zu induzieren. Diese DSBs können durch die Mechanismen der NHEJ oder der HR repariert werden. In somatischem Pflanzengewebe ist die NHEJ der bevorzugte Weg zur Reparatur eines DSB. Daher wird hauptsächlich diese zum gezielten Ausschalten bestimmter Gene verwendet, jedoch kann es dabei durch die Fehleranfälligkeit dieses Mechanismus zu unerwünschten Mutationen wie Indels oder chromosomalen Umlagerungen kommen. Im Rahmen des HR-vermittelten *Gene targetings* (GT) kann eine präzisere Editierung bestimmter Gene sowie die zielgerichtete Integration ektopischer DNA erreicht werden. Die Effizienz einer HR-basierten Genomeditierung ist im Vergleich zur Mutageneserate aufgrund der niedrigen Rate der HR im Vergleich zur NHEJ gering. Interessanterweise konnte in dieser Arbeitsgruppe zuvor gezeigt werden, dass die Induktion eines einzelnen SSB (*single strand break*, Einzelstrangbruch) kaum mutagen ist, aber zu einer Erhöhung der intrachromosomalen HR beiträgt (Fauser *et al.*, 2014).

Aufgrund des durch die Möglichkeit des Einsatzes künstlicher Nukleasen zum *Gene Editing* gestiegenen Interesses an der DSB-Reparatur wurden die Reparaturmechanismen für DSBs in vielen Studien in verschiedenen Organismen gründlich untersucht. In *Arabidopsis thaliana* konnte bereits die Rolle verschiedener an der DSB-induzierten HR beteiligten Proteine mit zwei verschiedenen intrachromosomalen HR-Reporterkonstrukten, die in verschiedene DNA-Reparaturmutanten gekreuzt wurden, analysiert werden (Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). Bisher ist jedoch nicht viel über SSB-vermittelte DNA-Reparaturmechanismen bekannt. So haben sich nur wenige Studien mit der Frage befasst, wie Einzelstrangbrüche in eukaryotischen Genomen repariert werden (Maizels und Davis, 2018; Vriend und Krawczyk, 2017). Um einen tieferen Einblick in die Reparaturmaschinerie von SSBs in Pflanzen zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Cas9-Nickase zur Induktion von SSBs in zwei verschiedenen HR-Reporterlinien verwendet.

3.3.1 Konzeption und Optimierung der Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung der Erhöhung von somatischer HR nach Induktion eines SSBs wurden die homozygot stabil transformierten Reporterlinien DGU.US und IU.GUS (Abbildung 3-16, Orel *et al.*, 2003) verwendet. Beide Linien tragen die Sequenz für das bakterielle *uidA* Gen (*GUS*), welche für das Enzym β -Glucuronidase codiert. Diese ist jedoch durch eine kurze *spacer* Sequenz unterbrochen und somit nicht funktionell. Durch die Induktion eines Bruches in diesem *spacer* und anschließender

3. Ergebnisse

Reparatur über somatische HR kann die Sequenz restauriert werden. Dabei kann über das DGU.US Reporterkonstrukt aufgrund des Aufbaus mit zwei aufeinanderfolgenden Sequenzwiederholungen SSA-basierte Rekombination, über das IU.GUS Konstrukt mit einer invertierten Homologie *upstream* des *GUS*-ORF SDSA-basierte Rekombination oder eine Genkonversion nachgewiesen werden. Dies geschieht durch die Messung der Enzymaktivität der exprimierten β -Glucuronidase mittels verschiedener Substrate. Für den Nachweis der HR-Induktion können zwei unterschiedliche Methoden angewandt werden. Zum einen die histochemische Färbung mit X-GlcA, bei der durch die β -Glucuronidase ein indigofarbenes Endprodukt gebildet wird, zum anderen der 4-MUG Assay, bei dem die Menge des gebildeten Endproduktes 4-MU über eine Analyse der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden kann.

Für die Expression der Nickase zur SSB-Induktion in den Reporterlinien wurden in dieser Arbeit die zuvor veröffentlichten Vektoren pDe-*SpCas9*-D10A+SSA und pDe-*SpCas9*-D10A+SDSA verwendet (Fauser *et al.*, 2014). Die sgRNAs beider Konstrukte (SSA, SDSA) binden im jeweiligen *spacer* der entsprechenden Reporterlinie (Abbildung 3-16). In allen Expressionsvektoren wurde für eine Transformation in T-DNA Insertionsmutanten, die oftmals schon eine Kanamycin-Resistenz beinhalten, der pflanzliche Selektionsmarker Kanamycin (*npt II*) gegen Gentamycin ausgetauscht. Nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation der Konstrukte in die passenden Reporterlinien wurde das daraus resultierende Saatgut auf Selektionsmedium ausgebracht und zwei Wochen alte Primärtransformanten identifiziert.

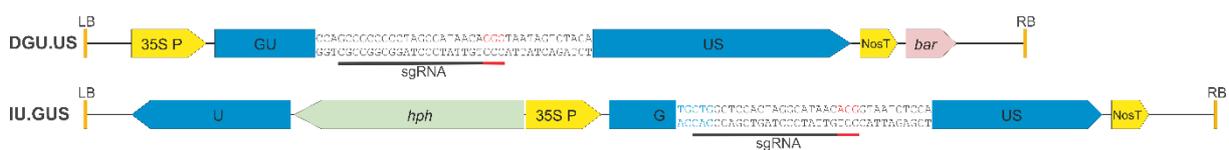


Abbildung 3-16: Reporterkonstrukte DGU.US und IU.GUS zum Nachweis induzierter HR.

Die Reporterkonstrukte DGU.US und IU.GUS sind stabil und homozygot im *Arabidopsis* Genom integriert. Beide bestehen aus einem durch eine kurze Sequenz (*spacer*, komplett dargestellt) unterbrochenen *GUS*-Gen (blau). Durch Induktion eines Bruches im *spacer* über das CRISPR/Cas-System kann es nach Reparatur zur Restauration des *GUS* *open reading frames* kommen. Die Expression steht dabei unter Kontrolle des 35S-Promotors des *Cauliflower Mosaic Virus* und dem Nos-Terminator aus *A. tumefaciens* (gelb). Als pflanzlicher Selektionsmarker dient bei der DGU.US Reporterlinie PPT (*bar*, rosa) und bei der IU.GUS Reporterlinie Hygromycin (*hph*, grün). Ein wiederhergestelltes *GUS*-Gen in DGU.US weist auf eine Reparatur über den SSA-Mechanismus mittels der repetitiven Sequenz *up-* und *downstream* des Bruches hin. In der IU.GUS Reporterlinie zeigt die Restauration des *GUS*-Gens eine Reparatur unter Verwendung des SDSA-Mechanismus anhand der *upstream* liegenden, intakten Teilsequenz von *GUS* (U) als Matrize oder eine Genkonversion an.

In vorherigen Experimenten konnte eine sehr hohe Aktivität der β -Glucuronidase nach SSB-Induktion mittels der *SpCas9*-Nickase unter dem Ubiquitin-Promotor (*PcUbi4-2*) festgestellt werden, sodass keine histochemische Färbung zur quantitativen Analyse durch das Auszählen einzelner Punkte verwendet werden konnte. Für die Quantifizierung der Effizienz der SSB-induzierten HR wurde deshalb ein 4-MUG Assay nach Weigel und Glazebrook (2002) durchgeführt (Kapitel 2.2.1.1). Da auch DNA-Reparaturmutanten untersucht werden sollten, wurden für die Messung der β -Glucuronidase Aktivität nicht ganze Pflanzen getestet, sondern die Aktivität in einer abgewogenen Menge Pflanzenmaterial gemessen. Somit sollten Messabweichungen durch das möglicherweise verringerte Wachstum in der Mutante ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten über eine Standardkurve des Endproduktes 4-MU in nmol 4-MU umgerechnet, sowie die Umsatzrate [nmol/min] über die Steigung der Fluoreszenzintensität über 30 min berechnet. Zur Normalisierung der Umsatzrate wurde die Proteinmenge in jeder Probe über einen Lowry Assay (Kapitel 2.2.1.1) gemessen. Die so erhaltenen Daten sollten robuster und besser untereinander vergleichbar sein.

3.3.2 Analyse der SSB-induzierten HR in *rad54* und *rad5a* Mutanten

Welche Faktoren in der SSB-induzierten HR eine Rolle spielen, ist bisher nicht geklärt. Interessanterweise wurden für Säugetierzellen widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. Einerseits wird den klassischen Faktoren, die an der HR nach DSB-Induktion beteiligt sind, eine Rolle zugeschrieben. Andererseits konnte keine Beteiligung dieser an der SSB-induzierten Reparatur mittels Homologien festgestellt werden (Davis und Maizels, 2014; Vriend *et al.*, 2016; Nakajima *et al.*, 2018). Um herauszufinden, ob sich in Pflanzen die Mechanismen zur DSB-induzierten und SSB-induzierten HR gleichen oder unterscheiden, wurden die T-DNA Insertionsmutanten *rad54-1* und *rad5a-2* untersucht. Für beide Faktoren konnte in vorherigen Experimenten eine Beteiligung an der Reparatur des IU.GUS Rekombinationssubstrates gezeigt werden, jedoch nicht am DGU.US Substrat (Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). Damit sind beide Proteine in somatischen Pflanzenzellen nicht am SSA-Mechanismus der HR beteiligt, aber in einen Reparaturmechanismus der Homologie-abhängigen Genkonversion involviert.

Zunächst wurden die Expressionsvektoren für die Cas9-Nickase aus *S. pyogenes* mit dem Ubiquitin-Promotor (pDe-*SpCas9*-D10A+SSA und pDe-*SpCas9*-D10A+SDSA) mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in die Reporterlinien DGU.US und IU.GUS sowie in die beiden Mutantenlinien im jeweiligen Reporterhintergrund eingebracht. Das daraus resultierende Saatgut wurde auf Selektionsmedium mit Gentamycin ausgebracht und für jede Linie in drei Replikaten etwa 200 mg

3. Ergebnisse

Pflanzenmaterial von Primärtransformanten sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Mörsern des Materials sowie der Extraktion der β -Glucuronidase daraus, wurde mittels des Fluoreszenz-basierten Testsystems, dem 4-MUG-Assay, die HR-Ereignisse quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-17 dargestellt. Die Rohdaten zur Auswertung sind im Anhang Tabelle 8-15 zu finden.

In den Negativkontrollen, den untransformierten Linien, konnten nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten (FI) nachgewiesen werden. Für alle anderen Proben wurde ein linearer Anstieg der FI über 30 min gemessen. Im Allgemeinen wurden im DGU.US Hintergrund weit höhere Werte als im IU.GUS Hintergrund festgestellt, was mit Ergebnissen aus früheren Studien übereinstimmend ist (Orel *et al.*, 2003; Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012; Fauser *et al.*, 2014). Die FI korreliert mit der Menge an 4-MU, welches als Produkt beim Umsatz von 4-MUG durch die β -Glucuronidase entsteht, und damit mit der Anzahl an erfolgreichen Restaurierungen des *GUS*-Gens in den Reporterlinien. Mit der Umrechnung der FI über eine Standardkurve in nmol 4-MU und dem Anstieg des Produktes über die Zeit konnte die Umsatzrate der einzelnen Replikate berechnet werden. Zusätzlich wurden alle Proben auf ihre Proteinkonzentration, die mithilfe eines Lowry Assays gemessen wurde (Anhang Tabelle 8-16), normalisiert. Alle Replikate der Linien im DGU.US Hintergrund wiesen eine Umsatzrate der β -Glucuronidase von etwa 1 nmol/(min* μ g) auf. Die Proben im IU.GUS Hintergrund liegen im Mittel bei 0,12 nmol/(min* μ g). Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Reporterhintergründen wurden die Daten auf den jeweiligen Wildtyp normalisiert. Es konnte weder für die *rad54* Mutante (Abbildung 3-17 A), noch die *rad5a* Mutante (Abbildung 3-17 B) ein Unterschied zur jeweiligen Wildtyp-Reporterlinie festgestellt werden. Da weder eine Reduktion noch eine Erhöhung der HR beobachtet werden konnte, liegt keine Involvierung der Proteine in Reparatur vor. Damit unterscheidet sich der Mechanismus hinter der SSB-induzierten HR fundamental von der DSB-induzierten Reparatur.

3. Ergebnisse

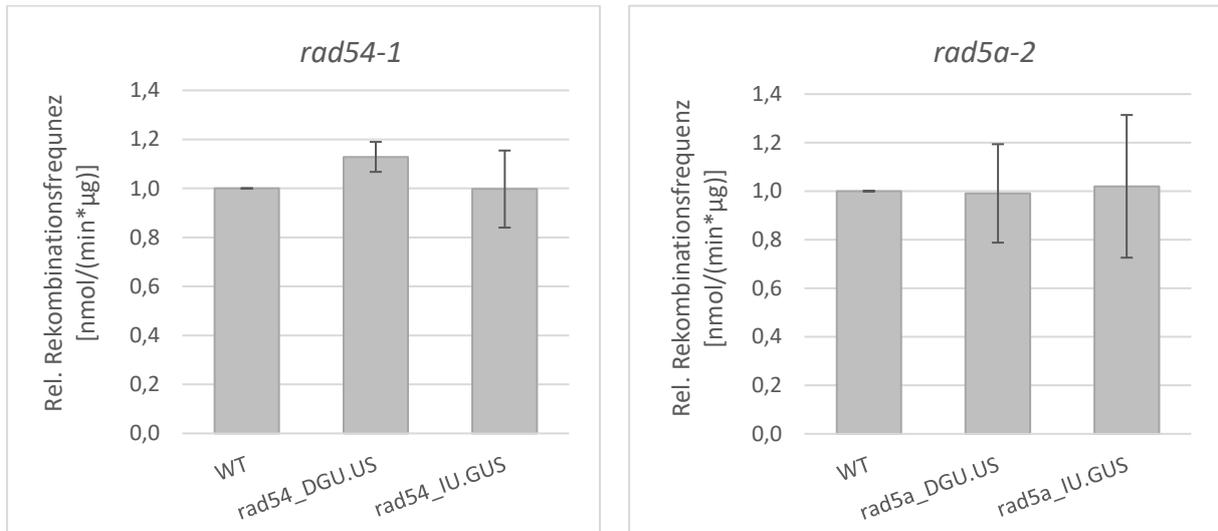


Abbildung 3-17: Bestimmung der relativen Rekombinationsfrequenz in *rad54* und *rad5a* Mutanten.

Angegeben sind die zum Wildtyp (WT = 1) relativen Rekombinationsfrequenzen der *rad54-1* und *rad5a-2* Mutanten in den beiden Reporterhintergründen DGU.US und IU.GUS. Für jede Linie wurden drei biologische Replikate untersucht (n = 3), die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zwischen diesen an. Beide Mutanten zeigen keine veränderte Rekombinationsfrequenz nach SSB-Induktion im Vergleich zum WT für den DGU.US wie auch den IU.GUS Reporter.

4 Diskussion

Angesichts der Herausforderungen bei der Ernährung der schnell wachsenden menschlichen Bevölkerung unter den Auswirkungen des Klimawandels auf die Landwirtschaft sind neue Pflanzensorten erforderlich, um diese Herausforderungen zu bewältigen. Da die konventionelle Züchtung an ihre Grenzen stößt, wurde die Entwicklung von Nutzpflanzen mit wünschenswerten Merkmalen mithilfe von Genomeditierungs-Werkzeugen zu einem Schwerpunkt in der Grünen Biotechnologie (Schmidt *et al.*, 2019b). Mit der Anwendung des CRISPR/Cas-Systems zur gezielten Induktion von ortsspezifischen DSBs ist ein Einsatz dieser Genomeditierungstechniken in Pflanzen nicht nur in der Grundlagenforschung, sondern auch zur Erzeugung und Verbesserung von landwirtschaftlich interessanten Merkmalen ohne große Mühen möglich (Wolter *et al.*, 2019).

Bisher lag der Fokus auf der Veränderung einzelner Gene (Zhang *et al.*, 2018; Schindele *et al.*, 2020). Im sogenannten *Gene Editing* können gezielt bestimmte Gene ausgeschaltet oder präzise editiert werden. Auch die zielgerichtete Integration ektopischer DNA ist möglich. Diese Methoden basieren auf der Induktion eines Sequenz-spezifischen Bruches in der Ziel-DNA und der anschließenden Reparatur über die Organismus-eigenen Mechanismen der NHEJ oder der HR. Durch die Eigenschaft des CRISPR/Cas-Systems zum *Multiplexing* können auch mehrere Gene gleichzeitig editiert werden. Durch die simultane Induktion mehrerer Brüche und anschließender, fehlerhafter Reparatur kann es aber auch zur illegitimen Verknüpfung von Bruchenden kommen. So können chromosomale Umlagerungen wie Deletionen, Inversionen oder Translokationen entstehen, die im Kontext des *Genome Engineering* zu Umstrukturierungen im genomischen Maßstab genutzt werden.

Um das volle Potential dieser Techniken auszuschöpfen, ist es von grundlegender Wichtigkeit, die dahinterliegenden Mechanismen zu verstehen (Puchta, 2005). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene CRISPR/Cas-induzierte Rekombinationsmechanismen analysiert. Dabei wurde nicht nur zum ersten Mal die CRISPR/Cas-vermittelte Induktion von Translokationen in Pflanzen und die Etablierung von Linien erreicht, die diese TL homozygot tragen, sondern auch die zugrundeliegenden Mechanismen beleuchtet (Kapitel 4.1). Des Weiteren wurde in HR-Reporterlinien die intrachromosomale HR nach SSB-Induktion untersucht. Hier konnte ein Einblick in die Mechanismen der SSB-induzierte HR gewonnen werden (Kapitel 4.2).

4.1 Etablierung eines Systems zur gezielten Induktion chromosomaler Translokationen und deren Vererbung in *Arabidopsis*

Mit der Einführung des CRISPR/Cas-Systems als biotechnologisches Werkzeug zur zielgerichteten Induktion von DSBs kam es zur Revolution in der Molekularbiologie (Jinek *et al.*, 2012). Seit 2012 ist eine Vielzahl an Studien erschienen, in denen diese Technologie in unterschiedlichen Organismen zu verschiedensten Zwecken eingesetzt wurde. Dies ist auf die Einfachheit der Programmierung der zielgerichteten Erkennung der DNA-Sequenz und der hohen Effizienz in den meisten Organismen zurückzuführen. In Pflanzen wurde das CRISPR/Cas-System hauptsächlich für die Induktion von Veränderungen an einzelnen Merkmalen verwendet, jedoch ist das Potential dieser Technologie weitaus größer und um dieses auszuschöpfen, sollten die nächsten Schritte unternommen werden. Für die Züchtung ist es wünschenswert, neben der Verwendung von DNA-freier Editierung und der Vermeidung von *off target*-Effekten das System für die Mutation von regulatorischen Elementen und für komplexere Genomumlagerungen anzuwenden (Puchta, 2017).

Bei diesen großen chromosomalen Veränderungen (*chromosomal rearrangements*, CRs) wird zwischen intra- und interchromosomalen Umstrukturierungen unterschieden. Zu ersteren zählen große Deletionen und Inversionen, zu zweiteren gehört der Austausch von Fragmenten zwischen heterologen Chromosomen wie unter anderem bei Translokationen. All diese CRs können durch die Einführung mehrerer DSBs gleichzeitig induziert werden.

In Säugern sind CRs, insbesondere Inversionen und Translokationen, oftmals assoziiert mit verschiedenen Krebsarten und anderen Krankheiten (Rowley, 2001; Thompson und Compton, 2011; Bunting und Nussenzweig, 2013). Deshalb ist es in diesem System von großer Bedeutung, diese Umstrukturierungen im Genom gezielt zu induzieren um Modelle für die Erforschung dieser Erkrankungen zu entwickeln. Ebenso ist die gezielte Umkehrung der krankheitsinduzierenden Merkmale von großer Bedeutung in diesem Forschungsgebiet. Aufgrund dieser Relevanz in der Humanmedizin wurde die Forschung in diesem Bereich stark vorangetrieben und es wurden schneller größere Fortschritte erzielt als in der Pflanzenforschung. Im mammalischen System konnten zur zielgerichteten Induktion aller Arten von CR-Ereignissen sowohl ZFNs und TALENs (Lee *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Piganeau *et al.*, 2013) wie auch das CRISPR/Cas-System (Cong *et al.*, 2013; Maddalo *et al.*, 2014; Blasco *et al.*, 2014; Cheong *et al.*, 2018) angewandt werden. Dabei ist die Möglichkeit des Multiplexing mithilfe des CRISPR/Cas-Systems durch die Verwendung mehrerer sgRNAs in Kombination mit der Cas9-Nuklease vorteilhaft im Vergleich zu anderen synthetischen Nukleasen. Eine

effiziente Induktion von Deletions- und Inversionsereignissen durch zwei mit dem CRISPR/Cas-System simultan eingeführte DSBs konnte in humaner und muriner Zellkultur nachgewiesen werden (Canver *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015b). Dabei wurde ein umgekehrt proportionales Verhältnis von Frequenz zu Größe der reorganisierten Fragmente festgestellt. Des Weiteren konnte in dieser Studie zum ersten Mal die erfolgreiche Übertragung von Inversionsereignissen in die Keimbahn von Mäusen nachgewiesen werden. Auch in Zebrafischembryonen konnte eine Transmission in die nächste Generation erreicht werden (Ota *et al.*, 2014), wenngleich dies aufgrund der geringen Effizienz ungleich schwieriger war. Die ersten Cas9-induzierte Translokationen in menschlichen Zellen wurden 2014 als Modell für verschiedene Krebsarten wie die Lymphom-induzierende Fusion NPM1-ALK (Ghezraoui *et al.*, 2014), die Knochenkrebsart Ewing-Sarkom (Renouf *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2014) und Lungenkrebs (Choi und Meyerson, 2014) verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass die Formation von TLs weit ineffizienter als die intrachromosomale Reparatur abläuft. Neben der Modellierung von chromosomalen Veränderungen, verantwortlich für verschiedene Krebsarten, ist für eine erfolgreiche Therapie auch das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen wichtig. Deshalb wurden die neuen Verbindungsstellen genauer untersucht. Dabei konnte je nach Sequenzumgebung auf eine Involvierung der NHEJ wie auch der HR geschlossen werden (Elliott *et al.*, 2005; Weinstock *et al.*, 2007).

In Pflanzen werden CRs mit evolutionären Prozessen wie Adaption, Spezifikation und Artbildung und der Ausbildung von Variabilität in Populationen assoziiert (Blanc *et al.*, 2000; Livingstone und Rieseberg, 2004; Kirkpatrick und Barton, 2006; Fang *et al.*, 2012; Schubert und Vu, 2016). Bisher wurde das Augenmerk hauptsächlich auf die Induktion von Deletionen mithilfe des effizienten CRISPR/Cas-Systems gelegt. Mit Einführung solcher Deletionen können ganze Gene, große Gencluster oder nicht-codierende regulatorische Sequenzen ausgeschaltet werden; echte *loss-of-function* Mutantenlinien für Funktionsstudien sind ohne Aufwand zu erzeugen. Neben kleineren Deletionen von bis zu 1 kb, die sowohl in *Arabidopsis* als auch in anderen Pflanzenspezies recht einfach zu erreichen sind (Kapusi *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2015; Upadhyay *et al.*, 2013; Brooks *et al.*, 2014), konnten in *Arabidopsis* Deletionen von 120 kb (Ordon *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018) und in vielen anderen Pflanzenarten wie Reis, Tabak, Tomate und *Medicago* Deletionen bis zu einer Größe von 245 kb induziert werden, jedoch mit deutlich niedriger Frequenz (Zhou *et al.*, 2014; Čermák *et al.*, 2017). Werden hierbei Promotoren eingesetzt, die während verschiedenen Stufen der sexuellen Reproduktion in Pflanzen aktiv sind und für die eine erhöhte Effizienz in der Vererbung von Mutageneseereignissen nachgewiesen werden konnte (Wang *et al.*, 2015; Eid *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2015; Tsutsui und Higashiyama, 2017), können diese CR-Ereignisse ebenfalls in die nächste Generation gebracht werden (Durr *et al.*, 2018). Eine Inversionsbildung nach simultaner

DSB-Induktion wurde dagegen in Pflanzen selten erreicht, und die Größe der induzierten Inversion war mit maximal 1,8 kb in Tabak vergleichsweise gering (Gao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017). 2019 führten Schmidt *et al.* jedoch eine umfassende Studie zur effizienten Inversionsbildung in *Arabidopsis* durch, bei der Inversionen von bis zu 18 kb mit einem Eizell-spezifischen Promotor für die Cas9-Expression erfolgreich auf die nächste Generation übertragen wurden (Schmidt *et al.*, 2019a). Die erfolgreiche Einführung von Translokationen mittels des CRISPR/Cas-Systems konnte bisher hingegen nicht dokumentiert werden. Diese Ereignisse sind sehr selten und wurden nur als Nebenprodukt mit sehr niedrigen Frequenzen bei der gezielten Genmodifikation mehrerer Stellen gleichzeitig beschrieben (Peterson *et al.*, 2016). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Sequenz-spezifischen Induktion von TLs zwischen heterologen Chromosomen entwickelt werden.

4.1.1 Das CRISPR/Cas-System aus *S. aureus* kann zur gezielten Induktion von Translokationen angewandt werden

Innerhalb dieser Arbeit konnte zum ersten Mal in Pflanzen die gezielte Induktion von Translokationsereignissen mithilfe des CRISPR/Cas-Systems erreicht werden.

Für eine Translokation sind zwei Brüche auf heterologen Chromosomen nötig, was in einem Austausch der Chromosomenarme resultieren kann. Da dieser Austausch nur in sehr niedrigen Frequenzen erwartet wurde, sollte die simultane und effiziente Induktion der beiden DSBs sichergestellt werden. Dafür wurde das Cas9-Ortholog aus *S. aureus* ausgewählt, da dieses zwei wichtige Kriterien erfüllt. Zum einen konnte eine erhöhte Mutageneserate dieses orthologen Systems im Vergleich zu dem System aus *S. pyogenes* in *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Steinert *et al.*, 2015). Zum anderen ist die SaCas9 ein *multiple-turnover* Enzym, was bedeutet, dass vergleichsweise öfter und auch schneller DSBs induziert werden können (Yourik *et al.*, 2019). Damit zeigt dieses Cas9-Protein eine höhere Aktivität als andere Orthologe auf und eignet sich hervorragend für die effiziente Induktion zweier DSBs zum gleichen Zeitpunkt. Für eine konstitutive Expression der Nuklease wurde diese unter die Kontrolle des Ubiquitin-Promotors gestellt. Die beiden Protospacer-Sequenzen wurden in intergenischen Bereichen circa 500 kb entfernt der Enden der langen Arme von Chromosom 1 und 2 gewählt. So sollten bei der Induktion einer Mutation oder einer Translokation keine Gene oder ihre Expression verändert werden. Nach Klonierung der Konstrukte wurden diese mittels Agrobakterien-vermittelter *floral dip* Methode in den Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* transformiert.

Neben der Wahl der Nuklease hat auch der verwendete *spacer* der sgRNA einen großen Einfluss auf die Schnitteffizienz der Nuklease (Doench *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2016). Ob an den in dieser Arbeit

gewählten Zielsequenzen durch die klonierten Expressionskonstrukte Brüche induziert werden konnten, wurde über einen T7-Endonuklease Assay überprüft. Für beide Protospacer konnte in allen untersuchten biologischen Replikaten eine erfolgreiche DSB-Induktion nachgewiesen werden. Da dieser Assay jedoch nur zur Abschätzung der Mutageneserate verwendet und keine quantitative Aussage über die Effizienz der Nuklease getroffen werden kann, wurden die Sequenzabschnitte um die Schnittstelle der *SaCas9* mittels NGS näher untersucht. Die Quantifizierung der Mutageneseeffizienz ergab Werte von über 70 % an beiden Protospacern, wobei die Induktion von Mutationen im Col-0 Hintergrund an PS2 auf Chr2 mit 89,7 % effizienter als an PS1-1 mit 74,8 % war. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den in ersten Analysen der Cas9-Nuklease aus *S. aureus* in Pflanzen erreichten Effizienzen (Steinert *et al.*, 2015).

Für die Quantifizierung der Translokationsfrequenzen wurden sechs biologische Replikate á 100 Primärtransformanten analysiert. Durch die gepoolte DNA-Isolation dieser großen Anzahl an Pflanzen sollte eine verlässliche und allgemeingültige quantitative Aussage getroffen werden können, die unabhängig von den natürlich auftretenden Varianzen der Einzelpflanzen ist. Je nach Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und dem Gewebetyp, in welchem das induzierte TL-Ereignis entsteht, ist die Weitergabe eines einzelnen Ereignisses an viele Tochterzellen möglich. Durch die Minimierung des Einflusses solcher klonalen Ereignisse mittels großer Poolgrößen sollte eine reproduzierbare Analyse gewährleistet werden. Als Methode zur absoluten Quantifizierung der induzierten Translokationsereignisse wurde eine *droplet digital* PCR (ddPCR) eingesetzt. Diese eignet sich durch mehrere Aspekte zum Nachweis seltener Ereignisse. Durch den Schlüsselaspekt dieser Technologie, der Kompartimentierung des Reaktionsansatzes, wird die DNA auf zehntausende einzelne Öltröpfchen (*droplets*) verteilt, in denen jeweils eine isolierte PCR stattfindet. Anschließend wird der Reaktionsansatz über einen speziellen *reader* ausgelesen, wobei über Fluoreszenzmessung für jedes Öltröpfchen eine digitale Ausgabe erfolgt, ob eine Amplifikation stattgefunden hat oder nicht. Im Vergleich zur klassischen qPCR ist die ddPCR als Endpunkt-PCR damit zur Berechnung der Anzahl der Ereignisse unabhängig von Amplifikationseffizienzen, welche in der qPCR hingegen als Grundlage der Quantifizierung dienen. Zusätzlich vorteilhaft ist die Möglichkeit der Detektion einzelner Moleküle, da über die Aufteilung der Gesamtmoleküle in mehrere Einzelreaktionen jede Amplifikation eines Ereignisses zu einem Signal führt. Um einen Flaschenhalseffekt durch die Vorverdünnung der Probe und den Einsatz von geringer Mengen dieser DNA zu umgehen und die Reproduzierbarkeit weiter zu erhöhen, wurde für jedes Replikat ein größerer ddPCR Ansatz verteilt auf acht Wells analysiert.

In allen biologischen Replikaten konnten TLs zwischen Chr1 und Chr2 nachgewiesen werden. Diese Ereignisse traten in Frequenzen von 0,003 % bis 0,013 % für J1 und zwischen 0,0005 % und 0,021 % für

J2 auf. Der Median sowie auch der Mittelwert der TL-Frequenz an J1 liegt bei 0,01 %, während die Werte an J2 etwas geringer sind (0,0055 % für den Median bzw. 0,0074 % für den Mittelwert). Die Detektion von weniger Ereignissen an J2 ist höchstwahrscheinlich auf eine Poly(T)-Sequenz zurückzuführen. Diese Sequenz von 20 aufeinanderfolgenden Thyminen kann die Amplifikationsreaktion negativ beeinflussen, da die Polymerase blockiert wird und dann dissoziiert, sodass eine effiziente Amplifikation über diese Region hinweg erschwert wird.

Trotz der ähnlichen Mittelwerte an beiden *Junctions* kann aus diesen Ergebnissen jedoch nicht geschlossen werden, dass die Verknüpfung zweier zuvor nicht verbundener Enden immer mit der Wiederverbindung der beiden anderen Enden korreliert. Vergleicht man die Frequenzen des Auftretens der beiden TL-*Junctions* in den einzelnen Replikaten, weichen diese oftmals stark voneinander ab (Tabelle 8-9 im Anhang). Da die Cas9-Nuklease in den Primärtransformanten aktiv ist, kann es während der Pflanzenentwicklung zur Entstehung nicht reziproker Ereignisse kommen, die im diploiden Chromosomensatz somatischer Zellen toleriert werden können. Die resultierenden Produkte können jedoch möglicherweise nicht korrekt durch eine Mitose laufen oder an die Nachkommen weitergegeben werden.

In den Boxplots der aufgetragenen TL-Frequenzen zeigen beide Boxen, die den Interquartilbereich beschreiben, nur eine geringe Breite auf, auch die Antennen sind kurz und keine Ausreißer konnten festgestellt werden. Dies weist auf eine verlässliche Analyse sowie eine hohe Reproduzierbarkeit der Daten hin. Zusätzlich spricht diese Verteilung der Ergebnisse für eine angemessene Poolgröße. TL-Frequenzen von 0,01 % scheinen nicht von großer Bedeutung, gerade im Hinblick auf eine Studie zur Induktion von TL in Tabak, bei der in 1 von 100 Fällen zwei DSBs, die durch *I-SceI* induziert wurden, auf die „falsche“ Weise wieder verbunden werden konnten (Pacher *et al.*, 2007). Wird jedoch die untersuchte Poolgröße in Betracht gezogen, zeigt sich ein anderes Bild. In den meisten bisherigen Untersuchungen zur spezifischen Induktion von CRs wurden in der Regel Einzelpflanzen über Markergene identifiziert oder ihre DNA mithilfe einer klassischen oder einer *nested* PCR untersucht (Pacher *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2015; Ordon *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Durr *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018). Tritt in einem solchen Ansatz ein einzelnes somatisches CR-Ereignis in einer Pflanze auf, wird diese als positiv gewertet. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit ein Gesamtpool der DNA jeder Zelle von 100 zwei Wochen alten Primärtransformanten zur Analyse herangezogen. Dabei wurde in jedem 10.000 Genom eine TL1-2 festgestellt. Da die Ereignisse wahrscheinlich gehäuft in einzelnen Pflanzen auftreten, unter anderem durch klonale Vermehrung der TL1-2 tragenden Zellen, ist von einer geringeren tatsächlichen Anzahl an Einzelpflanzen des Pools mit einer TL zu rechnen. Auch im Vergleich zu intrachromosomalen Strukturveränderungen wie Deletionen und Inversionen, bei denen

die Induktionsfrequenzen im Prozentbereich liegen (Schmidt *et al.*, 2019a), ist die Wahrscheinlichkeit des Einführens einer TL gering. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da es sich bei einer interchromosomalen Umlagerung um einen größeren Eingriff in die Chromosomenstruktur handelt als bei intrachromosomalen Veränderungen. Auch sind die neu zu verknüpfenden Enden weiter voneinander entfernt, da die DSBs auf heterologen Chromosomen induziert werden. Die verminderte Effizienz der TL-Formation im Vergleich zur intrachromosomalen CRs wurde in mammalischen Zellen ebenfalls gezeigt (Brunet und Jasin, 2018).

4.1.2 KU70 als limitierender Faktor für die TL-Bildung

Zur artifiziellen Generierung von TLs in Pflanzen ist eine gesteigerte TL-Frequenz wünschenswert. Im mammalischen System der Maus konnte für die c-NHEJ Faktoren KU70, LIG4 wie auch XRCC4 eine Rolle in der Unterdrückung der TL-Formation gezeigt werden (Simsek und Jasin, 2010; Weinstock *et al.*, 2007). Damit konnten in *ku70* Mutanten höhere Translokationsfrequenzen erreicht werden als im Wildtyp. Deshalb wurden zusätzlich zur Induktion von TLs im Wildtyp die im vorigen Kapitel beschriebenen Experimente in *ku70-1* T-DNA Insertionsmutanten durchgeführt. In dieser Mutante ist das *KU70* Gen durch die Integration einer T-DNA in Exon 8 unterbrochen und nicht mehr funktionell (Jia *et al.*, 2012). Das KU70-Protein wurde in *Arabidopsis* schon 2002 beschrieben und ist Bestandteil des KU-Heterodimers, welchem eine essentielle Rolle im c-NHEJ Reparaturweg zugeschrieben wird (Tamura *et al.*, 2002). Durch die Bindung der Bruchenden nach einem DSB und der Rekrutierung weiterer Proteine der c-NHEJ, wird die Reparatur eines DSBs in den Weg der c-NHEJ geleitet und andere Mechanismen unterdrückt (Fell und Schild-Poulter, 2015; Chang *et al.*, 2017).

Nach Transformation des Cas9-Expressionskonstruktes in die *ku70* Mutante wurden Primärtransformanten selektiert. Analog zum Wildtyp wurden sechs biologische Replikate der gDNA von je 100 Primärtransformanten erstellt und analysiert. Bei der Untersuchung der Cas9-Schnitteffizienz mittels des T7-Endonuklease Assays wie auch der NGS Analyse wurde im Vergleich zum WT für alle Replikate eine höhere Mutagenese-Frequenz festgestellt. Dies ist auf die allgemein stark erhöhte Mutationsrate nach DSB-Induktion in der Mutante zurückzuführen (Qi *et al.*, 2013b; Shen *et al.*, 2017a). Dabei war auch hier wie im WT die Effizienz an J2 mit einer fast vollständigen Veränderung aller untersuchten *reads* (97,7%) vergleichsweise zu J1 (89,6 %) höher. Des Weiteren wurde die TL-Induktion quantitativ mittels ddPCR ausgewertet. Die hier erzielten Ergebnisse lagen im Mittel bei etwa 0,045 % an J1 und 0,056 % an J2. Der berechnete und in den Boxplots aufgetragene Median lag bei 0,038 % an J1 und 0,046 % an J2. Der niedrigere Median zum Mittelwert lässt sich auf die große

Streuung der Werte der einzelnen biologischen Replikate zurückführen. Allgemein war eine stärkere Streuung nach oben zu beobachten. Besonders der hohe Wert der TL-Frequenz von 0,15 % an J2 in Replikat 4, der als Ausreißer gewertet wurde, stach aus den Daten heraus. Solch hohe Frequenzen sind vermutlich auf wenige Pflanzen zurückzuführen, in denen schon früh ein Ereignis induziert wurde und dieses sich klonal in der gesamten Pflanze vermehrte. Die Interquartilbereiche der Boxplots beider *Junctions* sind jedoch in ihrer Lage und in der Verteilung der Werte miteinander vergleichbar. Daher kann auch hier von einer angemessenen Poolgröße für die Untersuchung gesprochen werden. Zusammengefasst konnte an beiden *Junctions* eine signifikante Erhöhung der TL-Frequenz in der *ku70* Mutante im Vergleich zum WT gezeigt werden. Die ermittelten durchschnittlichen TL-Frequenzen von circa 0,05 % entsprechen einer 4,5-fachen (J1) bzw. 7,5-fachen (J2) Erhöhung im Vergleich zum WT. Hier zeigt sich ein starker Unterschied zwischen den *Junctions*, obwohl beide Verknüpfungspunkte in etwa gleicher Menge in den *ku70* Mutanten festgestellt werden konnten. Eine mögliche Erklärung ist die, zuvor im Zusammenhang mit der niedrigeren TL-Frequenz im WT an J2 im Vergleich zu J1 erwähnte, Poly(T)-Sequenz. Bei der NGS Analyse der Cas9-Schnitteffizienz ist dieser auf Chr1 liegende Abschnitt oftmals nicht mehr in den *reads* im Datensatz vorhanden. Daher könnte diese Sequenz in *ku70-1* auch an der J2 deletiert sein und damit die Amplifikation im Gegensatz zum WT nicht weiter stören. Geht man davon aus, dass in Col-0 durch die Störung der PCR weniger TL-Ereignisse als tatsächlich induziert detektiert werden konnten, kann eine etwas weniger starke Erhöhung, vergleichbar zu J1, angenommen werden.

Mit der signifikant erhöhten TL-Frequenz in der *ku70-1* Insertionsmutante wurden in dieser Arbeit für *Arabidopsis* vergleichbare Ergebnisse zu Mauszellen erreicht. Im starken Gegensatz zu den Ergebnissen von c-NHEJ defizienten Mauszellen konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die TL-Frequenz in menschlichen Zellen in Abwesenheit von LIG4 oder XRCC4 häufig verringert war (Ghezraoui *et al.*, 2014).

4.1.3 In *Arabidopsis* ist der c-NHEJ Mechanismen verantwortlich für die Entstehung von Translokationen, in Abwesenheit der c-NHEJ übernimmt der alternative Weg

Um eine kontrollierte Umstrukturierung des Pflanzengenoms zu erreichen, müssen die verschiedenen beteiligten Reparaturmechanismen berücksichtigt werden. In Pflanzenzellen gibt es zwei Hauptmechanismen der DSB-Reparatur, NHEJ und HR. Beide Mechanismen untergliedern sich wiederum in mehrere Wege. Die NHEJ zeichnet sich durch die direkte Verknüpfung der Bruchenden aus, die HR hingegen nutzt homologe Sequenzen zur Reparatur. Bei Säugetieren, *Drosophila* und Hefen

wurde bereits gezeigt, dass die DSB-Reparatur zu einer illegitimen Verknüpfung von Fragmenten führen kann (Richardson und Jasin, 2000; Egli *et al.*, 2004; Yu und Gabriel, 2004; Maggert und Golic, 2005). Die reziproke Translokation von Chromosomenarmen wird in Hefe von NHEJ und in *Drosophila* von HR vermittelt (Yu und Gabriel, 2004; Maggert und Golic, 2005). Für embryonale Stammzellen konnte der wechselseitige Austausch sowohl durch HR als auch NHEJ dokumentiert werden (Richardson und Jasin, 2000; Elliott *et al.*, 2005). Welcher Mechanismus zu tragen kommt, scheint von der Sequenzumgebung abzuhängen. In einer Studie in Tabak konnte ebenfalls eine Involvierung beider DSB-Reparaturmechanismen in die Bildung von TL gezeigt werden (Pacher *et al.*, 2007). Hier wurden zwei T-DNAs in das Pflanzengenom eingebracht, die jeweils einen nicht funktionellen Teil eines Selektionsmarkers trugen. Kam es nach DSB-Induktion durch I-SceI zur Verknüpfung der unabhängig integrierten T-DNAs, wurde der Marker wiederhergestellt. So konnte auf eine erfolgreiche TL selektioniert werden. In fast der Hälfte der Fälle wurden die Brüche über HR repariert. In diesem experimentellen Aufbau ist die hohe HR-Rate höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in der Nähe der Bruchstellen eine ausreichende Homologie verfügbar war und der Bruch über den Rekombinationsmechanismus des SSA wieder verbunden werden konnte. Dieser Weg wurde als effizientester unter den HR Mechanismen in somatischen Pflanzenzellen beschrieben (Orel *et al.*, 2003). Das SSA-Modell wurde erstmals für die extrachromosomale Rekombination zwischen Plasmiden in Säugetierzellen vorgeschlagen (Lin *et al.*, 1984; 1990). Im Set-up dieser Arbeit waren an den Bruchstellen jedoch keine Homologien vorhanden, sodass eine Reparatur mittels HR unwahrscheinlich erscheint.

In dieser Arbeit konnten bei der Induktion von TLs in *Arabidopsis* mehr Ereignisse in *ku70* Mutanten als in Wildtyp-Pflanzen identifiziert werden. Der dabei gemessene Anstieg der induzierten TLs um das etwa 4,5-fache im Vergleich zum Wildtyp ist beeindruckend. Welcher Mechanismus jedoch zur TL-Bildung und der erhöhten Frequenz beiträgt und ob diese erhöhte Frequenz für die Züchtung relevant und auch anwendbar ist, sollte in dieser Arbeit ebenfalls geklärt werden. Deshalb wurden neben der Quantifizierung die neu gebildeten Verknüpfungspunkte der TL-*Junctions* in Col-0 wie auch *ku70-1* qualitativ mittels NGS genauer untersucht.

Das in dieser Analyse beobachtete Reparaturmuster weist auf einen überwiegend Homologie-unabhängigen, aber trotzdem präzisen Mechanismus hin. Folglich lässt sich auf die Involvierung eines NHEJ-basierten Reparaturweges schließen. Da die ausgewerteten Daten im Wildtyp nur wenige über MHs entstandene TLs, sowie hauptsächlich fehlerfreie Verknüpfungen zeigten, ist eine Reparatur über alt-NHEJ unwahrscheinlich. Die *Junctions* wiesen eher die Charakteristika der c-NHEJ auf. Dieser Reparaturmechanismus wird oftmals als fehleranfällig beschrieben (Charbonnel *et al.*, 2010).

Verschiedene Studien in Säugern zeigen jedoch präzise Reparaturereignisse, basierend auf dem c-NHEJ Mechanismus, auf (Geisinger *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2018; Shou *et al.*, 2018; Sunder und Wilson, 2019). In Pflanzen hingegen wurden solche Ereignisse nach Induktion eines einzelnen DSB bisher noch nicht dokumentiert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Resultat einer fehlerfreien Ligation nicht von der Originalsequenz zu unterscheiden ist. Somit ist ein präzises Ereignis schwer nachweisbar. Ein weiterer Grund ist, dass bei einer artifiziellen DSB-Induktion, z. B. mit dem CRISPR/Cas-System, durch eine fehlerfreie Ligation die Erkennungssequenz der Nuklease wiederhergestellt wird. Damit kann die Nuklease erneut binden und einen Bruch induzieren. Dieser Kreislauf von DSB-Induktion und präziser Reparatur kann nur durch eine Veränderung der Zielsequenz unterbrochen werden (Abbildung 4-1 oben). Schlussendlich wird als Endergebnis eine Mutation detektiert. Werden jedoch mehr als ein DSB induziert und es kommt zu einer CR, wird durch die illegitime Verbindung zweier Bruchenden die Erkennungssequenz der Nuklease verändert und eine weitere Bruchinduktion kann nicht mehr stattfinden (Abbildung 4-1 unten). Daher müssen diese Ereignisse aus einem einzelnen Verbindungsereignis resultieren und nicht aus iterativen Zyklen von Bruch und Ligation. In dieser Arbeit konnte an den neuen Verknüpfungspunkten der TLs sowohl eine präzise wie auch eine fehlerhafte Reparatur festgestellt werden, wobei die fehlerfreien Ereignisse im WT-Hintergrund überwogen. Die Konservierung der DNA-Endsequenzen in vielen TL scheint überraschend. Dies steht jedoch im Einklang mit dem Schutz von DNA-Enden in der c-NHEJ und legt nahe, dass dieser Reparaturweg kein inhärent fehleranfälliger Prozess ist (Bétermier *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse der NGS Analyse der transformierten *ku70-1* Mutante zeigten einen deutlichen Unterschied zu den bereits erläuterten Ergebnissen im Wildtyp (Abbildung 3-6). Hier konnten an beiden neu gebildeten *Junctions* kaum präzise Verknüpfungen detektiert werden. Diese Ereignisse traten nur zu unter 1 % auf. Damit weisen fast alle analysierten *reads* aus der NGS-Analyse Mutationen an den Bruchstellen auf. Bei der genaueren Betrachtung dieser Mutationen konnten Unterschiede in den Reparaturmustern an den beiden *Junctions* in der *ku70* Mutante beobachtet werden. Diese sind auf die unterschiedliche Sequenzumgebung zurückzuführen. TL1-2 J1 wies in unmittelbarer Nähe der Bruchstelle mehrere MH auf, die zur Verbindung der Fragmente und damit zu ihrer Stabilisierung dienen könnten. Zusätzlich trat eine Sequenz in den NGS-Daten unproportional häufig auf (Abbildung 3-6 E, *ku70-1* 1-InDel). Dies könnte etwa ein Ereignis sein, das besonders stabil und deshalb oftmals unabhängig auftrat. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass dieses Ereignis in einer für den untersuchten

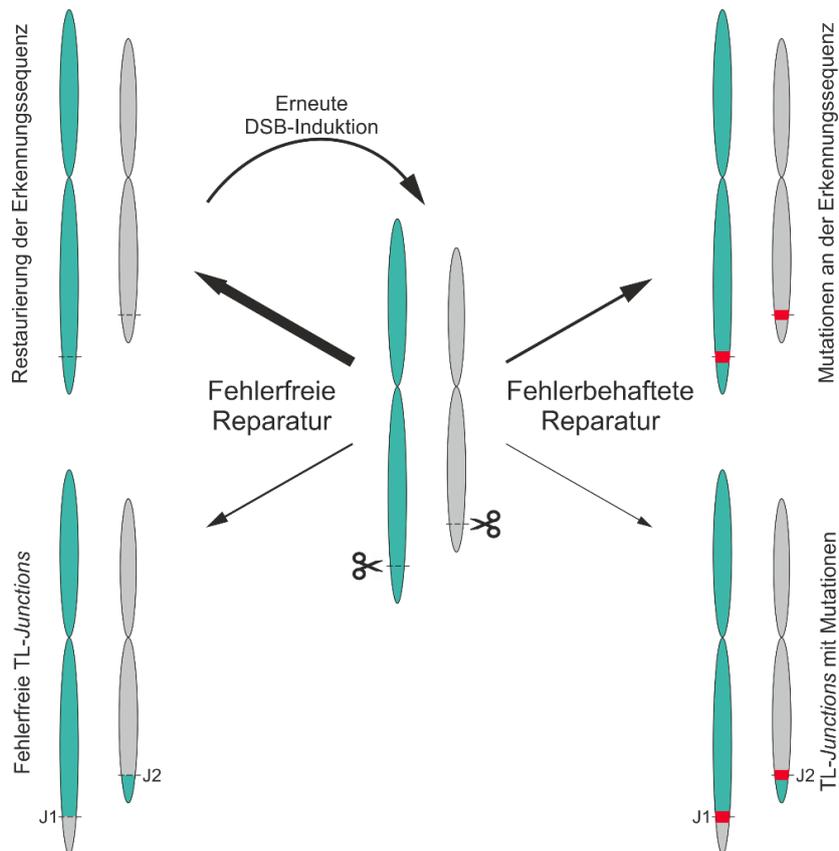


Abbildung 4-1: Übersicht über die möglichen Reparaturausgänge nach der Induktion zweier DSBs auf heterologen Chromosomen.

Nach der Induktion eines DSB in der DNA wird dieser meistens über den präzisen Mechanismus der c-NHEJ repariert. Dabei bleibt die Sequenz unverändert und eine erneute DSB-Induktion kann stattfinden (links oben). Dieser Zyklus von fehlerfreier Reparatur und erneuter DSB-Induktion kann solange stattfinden bis die Erkennungssequenz der Nuklease mutiert wird (rot, oben rechts). Bei gleichzeitiger Induktion von zwei DSBs auf heterologen Chromosomen kann auch die Ausbildung einer TL die Erkennungssequenz der Nuklease verändern, da an den *Junctions* die Sequenzen der heterologen Chromosomen verknüpft werden (unten). Diese Verknüpfung kann entweder fehlerfrei stattfinden oder zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit mit der Einführung von Mutationen (rot) an den *Junctions* einhergehen.

Pool verwendeter Pflanze sehr früh in der Entwicklung entstand und dadurch an viele Tochterzellen weitergegeben wurde. An TL1-2 beeinflusst die schon zuvor mehrmals erwähnte Poly(T)-Sequenz sowie weitere darauffolgende Sequenzwiederholungen, die alle auf Chr1 liegen, das Reparaturmuster (vergleiche Referenzsequenz im Anhang Kapitel 8.2.2). Solche Sequenzfolgen gelten als instabil und gerade in diesen Genombereichen herrscht eine hohe Variabilität, wodurch sich die beobachteten Veränderungen mit großen Deletionen und weniger Insertionen als an J1 erklären lassen. Insgesamt

verweisen die Reparaturmuster in den *ku70-1* Mutanten auf eine Reparatur mittels der alternativen NHEJ. Der Weg der alt-NHEJ zeichnet sich durch große Deletionen zwischen zwei MH oder komplexe *templated insertions* aus, welche alle an den analysierten *Junctions* im Mutantenhintergrund gehäuft vorkommen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen über die DSB-Reparatur in c-NHEJ Mutanten. Ist der klassische Weg beeinträchtigt, indem zum Beispiel Faktoren des Weges ausgeschaltet wurden, übernehmen alternative Mechanismen die Reparatur des DSB. Insbesondere das Ausschalten des KU70-Protein führt zu einer deutlichen Veränderung des Reparaturmusters in dem Bereich der DSB-Induktion. Als Schlüsselprotein der c-NHEJ bindet KU70 initial an die Bruchenden, schützt diese vor Resektion und rekrutiert weitere Faktoren für die Reparatur (Übersicht in Fell und Schild-Poulter, 2015). In Pflanzen konnte in *ku70* Mutanten eine erhöhte Mutationsrate beobachtet werden, die auf die Verwendung von MH am DSB zurückgeführt werden kann (Qi *et al.*, 2013b; Shen *et al.*, 2017a). Damit bestätigt sich weiterhin, dass im Wildtyp der Mechanismus der c-NHEJ für die Bildung von TLs verantwortlich ist.

Zusammengefasst sprechen diese Untersuchungen auf Sequenzebene für die Theorie, dass in Wildtyp-Pflanzen der klassische NHEJ-Weg für die Bildung von TL-Ereignissen verantwortlich ist. Beim Verlust dieses Reparaturweges übernimmt der alternative Mechanismus, wie auch bei der Reparatur eines einzelnen DSB.

Erst kürzlich konnten in *Arabidopsis* auch die Vorgänge beschrieben werden, welche an den intrachromosomalen Strukturveränderungen großer Deletionen und Inversionen beteiligt sind (Schmidt *et al.*, 2019a). Genau wie für die in dieser Arbeit induzierten interchromosomalen CRs wurden an den neuen Verknüpfungspunkten der intrachromosomalen CRs im Wildtyp hauptsächlich präzise Ligationereignisse beobachtet, während die *ku70-1* Mutante vermehrt Muster der alt-NHEJ-vermittelten Reparatur aufwies. Somit kann darauf geschlossen werden, dass in *Arabidopsis* die Bildung von CRs auf dem Mechanismus der c-NHEJ basiert, solange keine ausreichend langen Homologien zwischen den beiden Bruchstellen vorhanden sind. Damit ähneln sich die DSB-Reparatur zweier DSBs, die zu TLs führt, und die Reparatur eines einzelnen DSB. Auch in Säugern zeigt sich ein mit diesem Ergebnis übereinstimmendes Bild. Bei der Untersuchung der neuen Verbindungsstellen weiterer CRs unter anderem in einer Zellkultur von humanen, embryonalen Nierenzellen konnte für den Großteil der induzierten Deletionen sowie Inversionen eine fehlerfreie Ligation an den neuen Verknüpfungspunkten gezeigt werden, was auf die Beteiligung des c-NHEJ Reparaturweges hinweist (Shou *et al.*, 2018). Auch die Verknüpfungspunkte von TL wurden auf Sequenzebene analysiert (Brunet und Jasin, 2018). Hier konnte kein Beitrag der HR zur Bildung von TL gezeigt werden, an den neu

gebildeten *Junctions* waren keine signifikant langen Homologien vorhanden. Daher wurde auf eine Involvierung des NHEJ geschlossen. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurden zudem verschiedene Zelllinien untersucht, die in bestimmten Reparaturfaktoren defizient sind. In diesem Rahmen konnte gezeigt werden, dass die Zahl an präzisen Verbindungsereignissen nach Induktion von Deletionen und Inversionen in Δ CtIP-Zellen signifikant erhöht und in Δ XRCC4- und Δ LIG4-Zellen signifikant erniedrigt ist. Diese Tatsache deutet auf eine Beteiligung des c-NHEJ Reparaturwegs an der Entstehung von Inversionen und Deletionen in Säugerzellen hin (Guo *et al.*, 2018). In embryonalen Stammzellen der Maus hingegen wird die Bildung von TL durch die c-NHEJ Faktoren KU70, XRCC4 und LIG4 unterdrückt (Simsek *et al.*, 2011; Weinstock *et al.*, 2007; Boboila *et al.*, 2012). Zusätzlich konnte kein Einfluss auf die Anzahl an TL in POLQ-defizienten, murinen Zellen durch das Ausschalten dieses Schlüsselfaktors des MMEJ festgestellt werden. Wurde jedoch gleichzeitig das Schlüsselprotein des c-NHEJ KU70 deletiert, kam es zur synergistischen Erhöhung der TL-Frequenz (Wyatt *et al.*, 2016). In diesen Zellen weisen die Verknüpfungspunkte die typischen Charakteristika einer alt-NHEJ vermittelten Reparatur, wie größere Deletionen und längere Mikrohomologien als im klassischen Weg, auf. Im starken Gegensatz dazu steht, dass in menschlicher Zellkultur die TL-*Junctions* durch wenig bis keine Endprozessierung charakterisiert sind, was auf die Reparatur mittels c-NHEJ hindeutet (Brunet *et al.*, 2009; Ghezraoui *et al.*, 2014). Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Verlust der LIG4 oder ihres Partners XRCC4 die Entstehung von TL verringert. Damit kann darauf geschlossen werden, dass chromosomale Translokationen in menschlichen Zellen hauptsächlich von c-NHEJ gebildet werden, obwohl ein kleiner Beitrag von alt-NHEJ nicht ausgeschlossen werden kann. In Abwesenheit von aktiver Reparatur mittels c-NHEJ wird der Beitrag von alt-NHEJ kritisch.

Wenn jedoch die KU-vermittelte Reparatur der Hauptmechanismus der TL-Bildung in somatischen Pflanzenzellen ist, wie kommt die drastische Erhöhung der TL-Frequenz in *ku70* Mutanten zustande? Erwartungsgemäß sollten weniger TL auftreten, wenn der verantwortliche Weg eingeschränkt ist. In dieser Arbeit wurde jedoch überraschenderweise ein Anstieg der TL-Ereignisse gemessen. Dies deutet darauf hin, dass der Weg der alt-NHEJ anfälliger für illegitime Verknüpfung der Bruchenden ist, und im Umkehrschluss aber auch, dass in der c-NHEJ die Verknüpfung der ursprünglichen Enden sichergestellt wird. In Säugetieren sind verschiedene Faktoren bekannt, die an der Verankerung der beiden Bruchenden während der c-NHEJ beteiligt sind und somit den DSB stabilisieren können. In diesem Zusammenhang ist das Schlüsselprotein KU70 essentiell. Zunächst bindet jeweils ein KU70/80-Heterodimer an jedes Ende des DSB. Biochemisch und mit Hilfe der AFM (*atomic force microscopy*, Rasterkraftmikroskopie) konnte gezeigt werden, dass die KU-Heterodimere nach DNA-Bindung

miteinander assoziieren können und dies zu einem physikalischen *Tethering* der Bruchenden führt (Cary *et al.*, 1997; Ramsden und Gellert, 1998). Das resultierende Modell basiert auf der Annahme, dass sich die beiden Heterodimere zu einem Brückenkomplex verbinden, der anschließend die anderen Reparaturfaktoren rekrutiert. Die beiden c-NHEJ Faktoren XLF und PAXX, die beide mit dem KU-Heterodimer interagieren, sind sehr wahrscheinlich ebenfalls an der Verbindung der beiden Enden in Säugern und Vertebraten beteiligt (Ochi *et al.*, 2015; Graham *et al.*, 2018). Weiterhin wurde gezeigt, dass XLF die Bindung von XRCC4 an DNA stimuliert. Der dabei gebildete, heteromere Komplex aus XLF und XRCC4 kann zwei unabhängige DNA-Moleküle stabil überbrücken und dieser Brückenkomplex kann sich entlang der DNA bewegen (Brouwer *et al.*, 2016). Dadurch werden die DNA-Enden im anfänglich weiträumige Komplex, dessen Bildung das KU-Heterodimer erfordert, näher zusammen gebracht und die anschließende Verknüpfung vereinfacht (Graham *et al.*, 2016). In Pflanzen wurden bisher nur Homologe der c-NHEJ Faktoren KU70/KU80, LIG4 und XRCC4 identifiziert. Daher könnte neben dem KU-Protein XRCC4, auch im Komplex mit der Ligase, die Kohäsion der beiden Enden in Pflanzen unterstützen. Durch den Verlust des KU70-Proteins ist es somit eher der Fall, dass die ursprünglichen Bruchenden nicht miteinander assoziiert bleiben. Wenn nun mehrere DSBs gleichzeitig im Genom induziert werden, steigt dadurch die Wahrscheinlichkeit einer illegitimen Verknüpfung mit anderen Bruchenden.

Zusätzlich zur Stabilisierung der Enden eines DSBs spielt auch die Lage der DSBs zueinander eine entscheidende Rolle, da sich die Bruchenden für eine Neuverknüpfung logischerweise in räumlicher Nähe befinden sollten (Übersicht in Gothe *et al.*, 2018). Ursprünglich wurden zwei Theorien aufgestellt, um zu beschreiben, wie Enden von verschiedenen DSBs aufeinandertreffen können. Die "*Contact-First*"-Theorie schlägt vor, dass Interaktionen zwischen nicht zusammengehörenden Bruchenden nur stattfinden können, wenn diese zum Zeitpunkt der Bruchinduktion kolokalisiert sind (Serebrovski, 1929). Die "*Breakage-First*"-Theorie geht davon aus, dass an entfernten Orten gebildete Brüche anschließend zusammengeführt werden können (Sax, 1941). Dafür ist jedoch eine Migration der DSBs vor der Interaktion über große Entfernungen im Kern notwendig. In *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen führt die Induktion von DSBs zu einer erhöhten Bewegung unbeschädigter Chromosomen und der Bruchstelle selbst (Dion und Gasser, 2013; Miné-Hattab und Rothstein, 2012). Hier ist diese Mobilität abhängig von Faktoren der HR. Auch konnten Ansammlungen von mehreren DSBs in Reparatur-Foci beobachtet werden (Lisby *et al.*, 2003). Die Rekrutierung geschieht in Hefezellen in der S-Phase des Zellzyklus, wobei die Reparaturzentren bereits eine hohe Konzentration an Reparaturproteinen enthalten. In Säugetierzellen sind die verfügbaren experimentellen Daten widersprüchlich. In HeLa Zellen wurde gezeigt, dass sich chromosomale Regionen innerhalb von Minuten nach der DSB-

Induktion aufeinander zu bewegen können und dass dies zu einer Clusterbildung dieser führen kann (Aten *et al.*, 2004). Hier tritt diese Zusammenführung mehrerer DSBs im Gegensatz zu *S. cerevisiae* hauptsächlich in der G1-Phase auf, und an den einzelnen Brüchen befinden sich bereits Reparaturproteine. Diese Zellzyklus-abhängige Beweglichkeit des Chromatins wurde in weiteren Studien bestätigt (Thomson *et al.*, 2004; Pliss *et al.*, 2009; Krawczyk *et al.*, 2012). Während die Studie von Aten *et al.* (2004) die "Breakage-First"-Theorie unterstützt, weisen andere Studien in Säugern auf die "Contact-First"-Theorie hin. In Säugetierzellen wurde nach Induktion einer extensiven Chromosomenschädigung mittels Strahlung gezeigt, dass beschädigte DNA weitgehend stationär ist (Nelms *et al.*, 1998; Kruhlak *et al.*, 2006). Auch nach gezielter DSB-Induktion wurde eine positionelle Unbeweglichkeit der DSBs im Zellkern von Säugern festgestellt (Soutoglou *et al.*, 2007). In dieser Studie konnte zusätzlich eine Abhängigkeit der Beweglichkeit der DSBs von KU80 beschrieben werden, weshalb darauf geschlossen wurde, dass dieses Teilprotein des KU-Heterodimers dazu beiträgt, die lokale Bewegung gebrochener Chromosomenenden einzuschränken. Während der vorherrschende Reparaturmechanismus der c-NHEJ die Mobilität von DSBs einschränkt (Roukos *et al.*, 2013), konnte eine erhöhte Mobilität chromosomaler Bereiche bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit der Suche nach homologen Bereichen im Rahmen der HR beobachtet werden (Aymard *et al.*, 2017; Cho *et al.*, 2014; Schrank *et al.*, 2018). Zusätzlich konnte auch das Protein PARP1, ein Faktor der alt-NHEJ (Audebert *et al.*, 2004), mit der Beweglichkeit und dem Clustering von Brüchen in Verbindung gebracht werden (Singatulina *et al.*, 2019). Die durch PARP1 vermittelte ADP-Ribosylierung führt zur Synthese von PAR (Poly(ADP)-Ribose)-Ketten an den geschädigten Stellen und diese können wiederum von FUS (*fused in sarcoma*) gebunden werden. Das rekrutierte FUS erzeugt im Folgenden dynamische Kompartimente, in denen sich beschädigte DNA ansammelt. PARP1 konkurriert mit KU70 um die initiale Bindung der Bruchenden und initiiert anschließend über die ADP-Ribosylierung die alt-NHEJ durch Rekrutierung weiterer Faktoren (Audebert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Mateos-Gomez *et al.*, 2015). Die vorübergehende Bildung solcher Kompartimente könnte die schnelle Reparatur von beschädigter DNA fördern, da alle für die Reparatur benötigten Faktoren sich konzentriert an einem Ort befinden (Schrank *et al.*, 2018; Singatulina *et al.*, 2019). Jedoch scheint die Ansammlung mehrerer DSBs in Clustern potenziell gefährlich zu sein, da eine Fehlfunktion der Reparatur zu genomischen Umlagerungen führen kann.

Diese Ergebnisse aus Säugern, inwiefern sich die räumliche Organisation auf die TL-Bildung auswirkt, vereinigen die Modelle „Contact-First“ und „Breakage-First“. Dabei erscheint die "Contact-First"-Theorie als der dominierende Mechanismus, da im anderen Fall durch die immer erfolgende Kompartimentierung die Wahrscheinlichkeit inkorrekturereignisse erhöht wird. Auch kann

ersteres Modell den Unterschied in den Frequenzen verschiedener CRs erklären. Bei der Induktion von intrachromosomalen CRs liegen beide DSBs in räumlicher Nähe auf dem gleichen Chromosom. Die Brüche, die zu interchromosomalen CRs wie TLs führen können, befinden sich auf heterologen Chromosomen und sind damit verteilt im Genom. Dies vermindert die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens dieser unabhängigen DSB-Enden. Somit sind TL-Frequenzen geringer als Inversionsfrequenzen und auch Deletionsfrequenzen. Wenn die illegitime Verbindung der Brüche vorwiegend stattfindet, wenn sich die betroffenen Chromosomen in unmittelbarer Nähe befinden, kann auch das häufige Auftreten reziproker TL erklärt werden. Die Beobachtung der Immobilität gebrochener Chromosomenenden begründet ebenfalls, warum in räumlicher Nähe positionierte Genorte häufige Partner bei chromosomalen TL sind, und legt nahe, dass die nicht-zufällige räumliche Verteilung in Genomen einen wesentlichen Beitrag zur Bestimmung der TL-Frequenzen leistet (Meaburn *et al.*, 2007; Branco und Pombo, 2006).

Die hier beschriebenen Mechanismen aus Säugern lassen darauf schließen, dass sich die überwiegende Mehrheit der TL aus vorpositionierten proximalen DSBs bildet, obwohl eine kleine Teilmenge der TL aus DSBs erzeugt werden kann, deren Enden eine Bewegung mit großer Reichweite erfahren. Dies lässt sich auf die in dieser Arbeit induzierten TL-Ereignisse übertragen. Hier konnten an den *WT-Junctions* hauptsächlich fehlerfreie Ligationereignisse oder nur minimale Veränderungen der Sequenz beobachtet werden, die durch die Mobilitäts-einschränkende c-NHEJ entstanden sind. Doch konnten auch zu einem geringeren Teil Ereignisse detektiert werden, die auf den Mechanismus der alt-NHEJ zurückzuführen sind. Zusätzlich könnten dieselben Mechanismen wie in Säugern für die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit einer chromosomalen Strukturänderung in Pflanzen verantwortlich sein, in denen die c-NHEJ beeinträchtigt ist. Einerseits stabilisiert in Abwesenheit des KU-Heterodimers kein Proteinkomplex die beiden Bruchenden, was die Wahrscheinlichkeit einer Verknüpfung von Bruchenden erhöht, die ursprünglich nicht verbunden waren. Andererseits könnte die Clusterbildung beschädigter DNA-Regionen, die bei Säugetieren mit der alt-NHEJ in Verbindung gebracht wird, die beiden DSBs nahe zueinander bringen, was wiederum die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines CR-Ereignisses erhöht.

4.1.4 Die Eizell-spezifische Expression der Cas9-Nuklease ermöglicht die gezielte Induktion vererbbarer Translokationen sowie die Etablierung homozygoter TL-Linien durch Anwendung eines effizienten Protokolls

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits die effiziente Induktion von TL zwischen Chr1 und Chr2 erfolgreich dokumentiert werden. Zusätzlich konnte auch ein Einblick in die der TL-Formation zugrundeliegenden Mechanismen gewonnen werden. Neben diesen Grundlagenfragen beschäftigte sich diese Arbeit auch mit der anwendungsorientierteren Induktion von vererbbaaren TL und die Etablierung von homozygoten Linien.

Eine Vererbung von in somatischen Zellen induzierten Veränderungen ist in Pflanzen prinzipiell möglich, da diese keine prädeterminierte Keimbahn besitzen (Walbot und Evans, 2003). Jedoch birgt die Anwendung des zur Bruchinduktion meist ubiquitär exprimierten Cas9 Schwierigkeiten. Einerseits können die damit induzierten, somatischen Mutationen überall im Pflanzengewebe auftreten, müssen für eine Vererbung jedoch im meristematischen Gewebe vorhanden sein, welches für die Bildung von Keimzellen verantwortlich ist. Auch können bei einer stabilen Integration der T-DNA ins Pflanzengenom in jeder neuen Generation wieder Ereignisse induziert werden, falls eine Erkennungssequenz noch unverändert vorliegt. Dies kann zu chimären Pflanzen führen. Das bedeutet, dass eine positiv getestete Pflanze nicht unbedingt das gewünschte Ereignis auch stabil trägt und an die nächste Generation weitergeben kann. Durch diese falsch-positiven Ergebnisse wird die Analyse erschwert, da zwischen somatischen und keimbahngängigen Ereignissen nicht unterschieden werden kann. Eine Lösung dieser Problematik ist die veränderte Expression der verwendeten Nuklease. Durch Gewebs- oder Zyklus-spezifische Promotoren ist eine eingeschränkte Expression nur zum gewünschten Zeitpunkt möglich. Für eine Vererbung der induzierten TLs ist eine Induktion der beiden DSBs zu einem sehr frühen Entwicklungsstadium geeignet. Hier bietet sich das Stadium der Eizelle bzw. des einzelligen Embryos an. Zum einen liegt in der Eizelle nur ein haploider Chromosomensatz vor, sodass eine reziproke TL gegenüber aberranten Veränderungen wie dem Verlust von Chromosomenfragmenten oder Chromosomenfusionen eher bestehen kann. Zum anderen werden im einzelligen Stadium entstandene Ereignisse an jede sich daraus entwickelnde Zelle und somit an die gesamte Pflanze weitergegeben. Die erfolgreiche Anwendung eines Eizell (EC)-spezifischen Promotors konnte bereits sowohl im *Gene Editing* wie auch beim *Gene targeting* gezeigt werden. Bei der gezielten Mutagenese von verschiedenen Genen konnten in *Arabidopsis* innerhalb einer Generation homozygote Mutanten für mehrere Zielgene gleichzeitig generiert werden (Wang *et al.*, 2015). Ebenfalls in *Arabidopsis* konnte eine Steigerung der GT-Effizienz erzielt werden (Wolter *et al.*, 2018). Auch im *Genome Engineering*

konnte mithilfe der EC-spezifischen Expression der Nuklease die erfolgreiche Induktion und Vererbung von Deletions- und Inversionsereignissen nachgewiesen werden (Durr *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 2019a). Da bereits andere CRs erfolgreich auf die nächste Generation übertragen werden konnten, wurde für die Vererbung von TL-Ereignissen in dieser Arbeit ebenfalls eine EC-spezifische Expression der Cas9-Nuklease eingesetzt. Zusätzlich zur Klonierung der sgRNAs zur Induktion einer TL zwischen Chr1 und Chr2 (TL1-2) in den neuen Expressionsvektor wurden zwei weitere *Protospacer* auf Chr1 und Chr5 identifiziert und das entsprechende Konstrukt kloniert. Die Induktion der TL1-5 sollte zur Bestätigung dazu dienen, dass die TL-Bildung auch Sequenz- und Lage-unabhängig zwischen anderen Chromosomenfragmenten möglich ist. Beide Ansätze (Abbildung 4-2) wurden in *Arabidopsis* Pflanzen transformiert, wobei das Konstrukt EC-TL1-2 sowohl in den Col-0 wie auch den *ku70-1* Hintergrund, das EC-TL1-5 jedoch nur in Col-0 Pflanzen eingebracht wurde. Wie im vorigen Kapitel diskutiert, werden in der *ku70* Mutante erhöhte TL-Frequenzen erreicht, dafür ist diese Linie aber genomisch instabil und deshalb nicht für den Ansatz in der anwendungsorientierten Forschung geeignet (Bundock *et al.*, 2002; Riha *et al.*, 2002). Bei der *floral dip* Transformation wird die T-DNA in die Keimzellen eingebracht und durch eine direkte, transiente Expression der Nuklease ist eine Bruchinduktion nicht auszuschließen. Jedoch wurden aufgrund der zuvor gemessenen TL-Effizienz unter der Verwendung des Ubiquitin-Promotors in der T1-Generation im Wildtyp von rund 0,01 % von vornherein nur sehr wenige Ereignisse erwartet, weshalb die T1-Pflanzen nicht analysiert wurden, sondern jeder Primärtransformant einzeln durch Selbstung vermehrt wurde. Durch die stabile Integration der T-DNA in diesen Pflanzen, kann in deren Keimzellen eine TL induziert und an die Tochterpflanze vererbt werden. Diese T2-Generation wurde mittels PCR-basierter Genotypisierung untersucht. Hier konnten in Col-0::EC-TL1-2 unter 3.200 Einzelpflanzen aus 40 T2-Linien vier die TL tragende Pflanzen ermittelt werden. In *ku70-1*::EC-TL1-2 konnten schon nach der Analyse von 20 T2-Linien á 80 Einzelpflanzen acht positive Individuen gefunden werden, weshalb hier die Untersuchungen nicht weitergeführt wurden. Bei der EC-spezifischen Induktion der TL1-5 im Wildtyp wurde nur eine aus 3.200 analysierten T2-Einzelpflanzen als positiv identifiziert. Um eine effiziente Analyse einer so großen Menge an Einzelpflanzen zu gewährleisten, wurden Voruntersuchungen mit Pools aus der DNA von Blattmaterial von 40 Einzelpflanzen durchgeführt. Nur wenn die PCR-basierte Genotypisierung ein positives Ergebnis zeigte, wurde die DNA jeder einzelnen T2-Pflanze extrahiert und untersucht. So mussten beispielsweise im Ansatz Col-0::EC-TL1-2 eben nicht 3.200 DNA-Extraktionen analysiert werden, sondern 80 gepoolte Proben, zwei pro T2-Linie, und aus den erzielten Ergebnissen resultierend nur 120 einzelne Proben. Durch die Verringerung des Probenumfangs steigt die Wahrscheinlichkeit eine größere Anzahl an TL-Ereignissen zu ermitteln. Zur Identifikation von seltenen Ereignissen ist

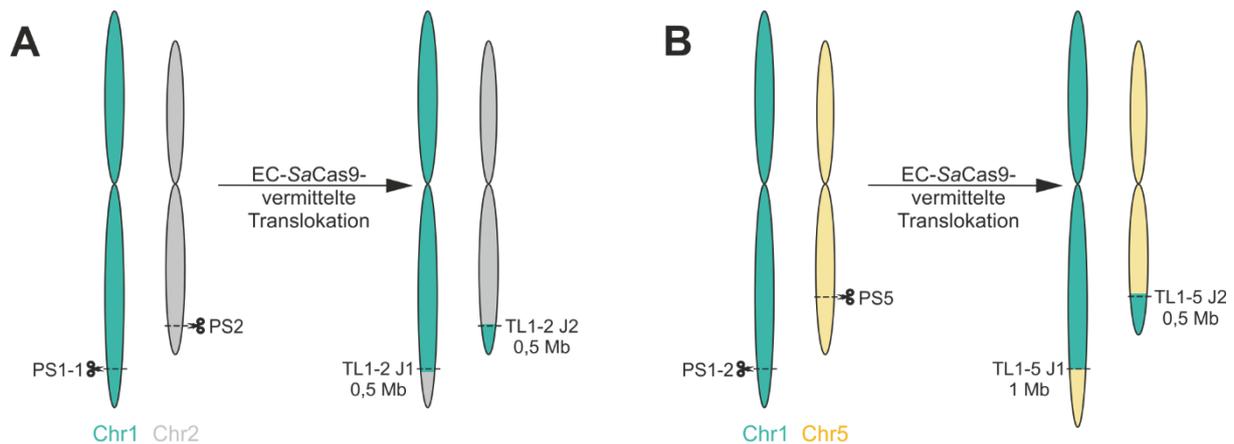


Abbildung 4-2: Schemata der durch die Cas9-Nuklease aus *S. aureus* (*SaCas9*) vermittelten Translokationen.

(A) Nach Induktion zweier DSBs auf Chromosom 1 (Chr1) und Chr2 kann es zu einem Austausch der 0,5 Mb langen Chromosomenarme kommen. Damit entsteht eine reziproke Translokation zwischen Chr1 und Chr2 (TL1-2). (B) Bei der Induktion der beiden DSBs auf Chr1 und Chr5 kann sich eine reziproke TL zwischen diesen beiden Chromosomen ausbilden (TL1-5). Dabei wird ein 1 Mb langes Fragment von Chr5 mit einem 0,5 Mb langen Stück des Chr1 ausgetauscht.

dieses Protokoll (siehe Abbildung 3-8) durch die Zeit- und Arbeitseinsparung sehr gut geeignet.

In der PCR-basierten Genotypisierung wurden nur reziproke TL-Ereignisse identifiziert, was dafür spricht, dass die TL sich tatsächlich schon im einzelligen Stadium ausgebildet hat. Dies ist für die Anwendung der Technik wichtig, da das Genom verzerrende Ereignisse schwieriger durch die Keimbahn gelangen. Durch die Verwendung des EC-Promotors und die Übertragung in die T2-Generation konnten nach den niedrigen Frequenzen in der T1 mit dem Ubiquitin-Promotor höhere Effizienzen an TL1-2 als erwartet erreicht werden. Im Col-0 Hintergrund liegt die Frequenz bei 0,125 %, was einem Ereignis unter 800 entspricht. In der *ku70* Mutante trägt sogar eine von 200 untersuchten Pflanzen eine TL, was einer Frequenz von 0,5 % gleichkommt. Der Unterschied in den verschiedenen Hintergründen entspricht den Daten der T1-Analyse mittels ddPCR. Die Erhöhung in der *ku70* Mutante kann also auf die zuvor diskutierten Mechanismen (Kapitel 4.1.3), unter anderem der höheren Anfälligkeit der alt-NHEJ für das Auftreten von CRs, zurückgeführt werden. Dabei wiesen in der Mutante mehr unabhängige T2-Linien ein TL-Ereignis auf, wobei die Effizienzen in den einzelnen Linien von bis zu 2,5 % im WT nur auf maximal 3,75 % in *ku70-1* anstiegen. Im Vergleich zur TL-Frequenz zwischen Chr1 und Chr2 ist das Auftreten der TL1-5 stark verringert. Hier konnte nur eine Frequenz von etwa 0,03 % ermittelt werden. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die niedrige Cas9-Schnitteffizienz auf Chr5 zurückzuführen (Abbildung 3-13). Da die simultane Induktion der beiden

DSBs Grundvoraussetzung für die Induktion einer chromosomalen Umlagerung ist, ist eine Korrelation von Cas9-Schnitteffizienz und TL-Frequenz naheliegend. Aus diesem Grund ist es wichtig, die ausgesuchten *Protospacer* zuvor auf die Cas9-Schnitteffizienz zu untersuchen. Für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Entstehung von TL-Ereignissen sollten immer Zielsequenzen mit hoher Cas9-Schnitteffizienz gewählt werden.

Alle im Col-0 Hintergrund als TL-tragend identifizierte Pflanzen sowie zwei *ku70-1* Pflanzen mit TL wurden vermehrt und anschließend auf Segregation bezüglich der TL mittels PCR-Analyse untersucht. Die T2-Pflanzen sollten in ihrem diploiden Chromosomensatz sowohl beide WT Chromosomen als auch die chimären Homologe der jeweiligen Chromosomen tragen, was theoretisch die Ausbildung vier verschiedener Gameten ermöglicht. Daher sollte die Hälfte ihrer Gameten genetisch unausgeglichen sein, da diese zwei Kopien eines translozierten Chromosomenarms tragen, aber keine des anderen. Da die genetische Information unvollständig ist, sind solche Gameten möglicherweise nicht lebensfähig oder tragen nicht zu einem erfolgreichen Befruchtungsereignis bei. Wenn sie dennoch in der Lage wären, ihre genetische Information auf die Nachkommen zu übertragen, wäre die Hälfte der resultierenden Nachkommen genetisch unausgewogen, was bedeutet, dass ein Chromosomenfragment in dreifacher Ausfertigung, das andere jedoch nur einmal vorliegen würde. In zwei aus 16 Fällen würden diploide Zygoten entstehen, denen ein Teil eines Chromosomenarms fehlt. Nur sechs Kombinationen würden zu einer ausgewogenen diploiden Nachkommenschaft führen. Dabei entspräche einer der 16 Genotypen (1/16) dem homozygoten WT, 1/16 einer homozygoten TL, 4/16 und damit $\frac{1}{4}$ wären heterozygot für die TL. Interessanterweise konnte in keiner T3-Linie eine Pflanze mit einem unausgewogenen Genotyp identifiziert werden. Dies spricht für die Tatsache, dass nur die Gameten, die entweder die zwei WT-Chromosomen oder die chimären Kopien der jeweiligen Chromosomen tragen, zur Keimbahn beitragen. Das aus diesen beiden haploiden Zellen resultierende 1:2:1 Segregationsverhältnis konnte bezüglich der TL1-2 in allen Linien bestätigt werden. In der TL1-5 Linie wurde eine Verschiebung der Segregation zugunsten des WT beobachtet. Dennoch wurden 10 % der Nachkommen als homozygot bezüglich der TL1-5 identifiziert. Das im Vergleich zur erwarteten Anzahl nach dem theoretischen Segregationsverhältnis verminderte Auftreten der homozygoten Pflanzen kann auf verschiedenste Gründe zurückzuführen sein. Zum einen könnte diese TL durch den Eingriff in die Chromosomenstruktur nicht mehr so stabil sein, wenn verschieden lange Fragmente transloziert wurden. Da dieser Unterschied in der Länge der Fragmente auf das gesamte Chromosom gesehen aber nur einen kleinen prozentualen Anteil von etwa 1 - 2 % ausmacht, ist diese Annahme unwahrscheinlich. Des Weiteren stehen TL auch in Zusammenhang mit der Beeinflussung der Epigenetik (Simon *et al.*, 2018; Riggi *et al.*, 2018). Da hierüber in Pflanzen noch wenig bekannt ist, kann

der Einfluss der TL1-5 auf die Chromatinstruktur nicht eingeschätzt werden. Dieses Phänomen der Verschiebung des Segregationsverhältnisses konnte in anderen Kulturpflanzen bei der Vererbung von TL ebenfalls beobachtet werden (Dobbels *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2017). Für das Ziel der Etablierung von homozygoten TL-Linien ist die Verschiebung des Segregationsmusters zu homozygoten Translokationen von 1/16 auf 1/4 bzw. auf 1/10 allerdings vorteilhaft.

Die Pflanzen homozygot für die jeweilige TL wurden vermehrt und die entsprechenden Nachkommen ausgiebig analysiert. Die Sequenzierung der Verbindungsstellen bestätigte einen konservativen und reziproken Austausch der Chromosomenarme. Dabei wurden im WT Hintergrund an den meisten *Junctions* keine Mutationen festgestellt. Die wenigen *Junctions* mit Mutationen wiesen ausschließlich kurze Deletionen auf. In den beiden untersuchten Linien der *ku70* Mutante wurden an J1 und an J2 komplexe Mutationen aus einer Kombination von Deletionen und Insertionen festgestellt. Dies deckt sich mit den in der NGS Analyse erhaltenen Daten. Auch hier wurden an fast allen *Junctions* der Mutante Mutationen gefunden, im WT hingegen zeigte der Großteil der Verknüpfungen eine fehlerfreie Ligation. Bei der Prüfung auf die Vollständigkeit der Fragmente nach der Translokation konnte diese bestätigt werden. Es war zu keinem Informationsverlust gekommen.

Neben der molekularen Analyse sollten die etablierten Linien mittels FISH-Analyse zytologisch untersucht werden. Dies sollte einen weiteren Beweis dafür liefern, dass die betreffenden Chromosomen tatsächlich die jeweils translozierten Fragmente trugen. Diese FISH-Analyse wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Andreas Houben vom IPK (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung) umgesetzt. Dafür wurden die Samen der in dieser Arbeit etablierten Linien an das IPK versendet und die FISH-Analyse wie in Lysak *et al.* (2001) beschrieben durchgeführt, wobei unterschiedlich markierte DNA-Sonden verwendet wurden, die für die Regionen um die Bruchstellen der TL spezifisch sind. Pools zusammenhängender BAC-Klone (Anhang Tabelle 8-7), die 0,8 bzw. 17,6 Mbp von Chr1 bzw. Chr2 überspannen, wurden verwendet, um die benachbarten Regionen der DSBs während mitotischer und meiotischer Teilungen der Translokationslinie TL1-2 zu markieren. Pools von 43-47 nt langen Sonden auf Oligobasis (<https://arborbiosci.com>, Han *et al.*, 2015), die eine Region von jeweils 1 Mbp überspannten, wurden eingesetzt, um die benachbarten Regionen von TL1-5-*Junctions* zu markieren.

Durch Markieren der Chromosomenarme an beiden Enden der Bruchstellen mit der differentiell markierten DNA vordefinierter BACs konnte die TL1-2 auf zytologischer Ebene nachgewiesen werden (Abbildung 4-3 B). Während mitotische und Pachytän-Chromosomen im WT getrennte Chr1- und Chr2-spezifische FISH-Signale zeigten, wiesen translozierte Chromosomen von TL1-2 kombinierte FISH-Signale auf. Dieselben Beobachtungen konnten für TL1-5 gemacht werden, wobei hier die Oligo-

basierte Sonden zur Markierung der DNA verwendet wurden (Abbildung 4-3 C). Für die Anwendung solcher TL-Linien in der Züchtung, ist es wichtig, dass diese fertil und mit anderen Linien uneingeschränkt zu kreuzen sind. Dazu wurden die homozygoten TL-Linien mit dem Wildtyp im Phänotyp und der Fertilität verglichen. Hier konnte sowohl für TL1-2 wie auch für TL1-5 ein mit dem WT vergleichbarer Wuchs demonstriert werden. In der Fertilitätsanalyse waren die TL-Linien ebenfalls mindestens genauso fertil wie der WT. Zusätzlich zur phänotypischen Analyse wurden Rückkreuzungen mit dem WT durchgeführt. Es war keine Einschränkung der Hybridisierung zu erkennen, unabhängig davon welche Linie als Mutter- oder Vaterpflanze verwendet wurde. Bei der Segregationsanalyse der F2-Generation dieser Kreuzungen wurden die gleichen Beobachtungen wie in der T3-Generation gemacht. Unter den Nachkommen wurden nur ausgeglichene Genotypen identifiziert und die Segregation folgte einer 1:2:1 Aufspaltung. Damit wurde nochmals bestätigt, dass genetisch nicht ausbalancierte Gameten nicht zur Keimbahnbildung beitragen. In der angesprochenen T3-Generation konnten keine *single locus*-Linien bezüglich der integrierten T-DNA identifiziert werden. Damit scheint die multiple Integration des Transgens das Auftreten einer TL zu erleichtern. Dies ist jedoch ein Problem in der Anwendung, da das Transgen in der resultierenden Endpflanze unerwünscht ist und sich diese nur in der induzierten TL vom Wildtyp unterscheiden sollte. Sind mehrere Kopien vorhanden, ist eine Entfernung der T-DNAs aus dem Genom durch Aussegregation erschwert. Durch die Möglichkeit der Rückkreuzung mit einer Linie ohne Transgen, können jedoch einfach Pflanzen identifiziert werden, die keine Cas9 mehr tragen. So konnten auch in dieser Arbeit Pflanzen erhalten werden, die die TL homozygot und kein Cas9-Transgen mehr im Genom tragen.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit ein effizientes System zur Induktion vererbbarer Translokationen entwickelt und mithilfe dieses erstmalig TL-tragende Linien, sowohl zwischen Chr1 und Chr2 wie auch zwischen Chr1 und Chr5, etabliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Induktion von TL nicht Loci-abhängig ist. Bei der genaueren Analyse einiger Linien wurde der Austausch der Chromosomenfragmente als reziprok und konservativ bekräftigt. Des Weiteren konnten im Wildtyp-Hintergrund zum Großteil fehlerfreie Ligation an den TL-*Junctions* festgestellt werden. Daher eignet sich die Kombination der Cas9-Nuklease aus *S. aureus* mit dem EC-Promotor hervorragend um chromosomale Umlagerungen wie TLs in *Arabidopsis* zu erzielen.

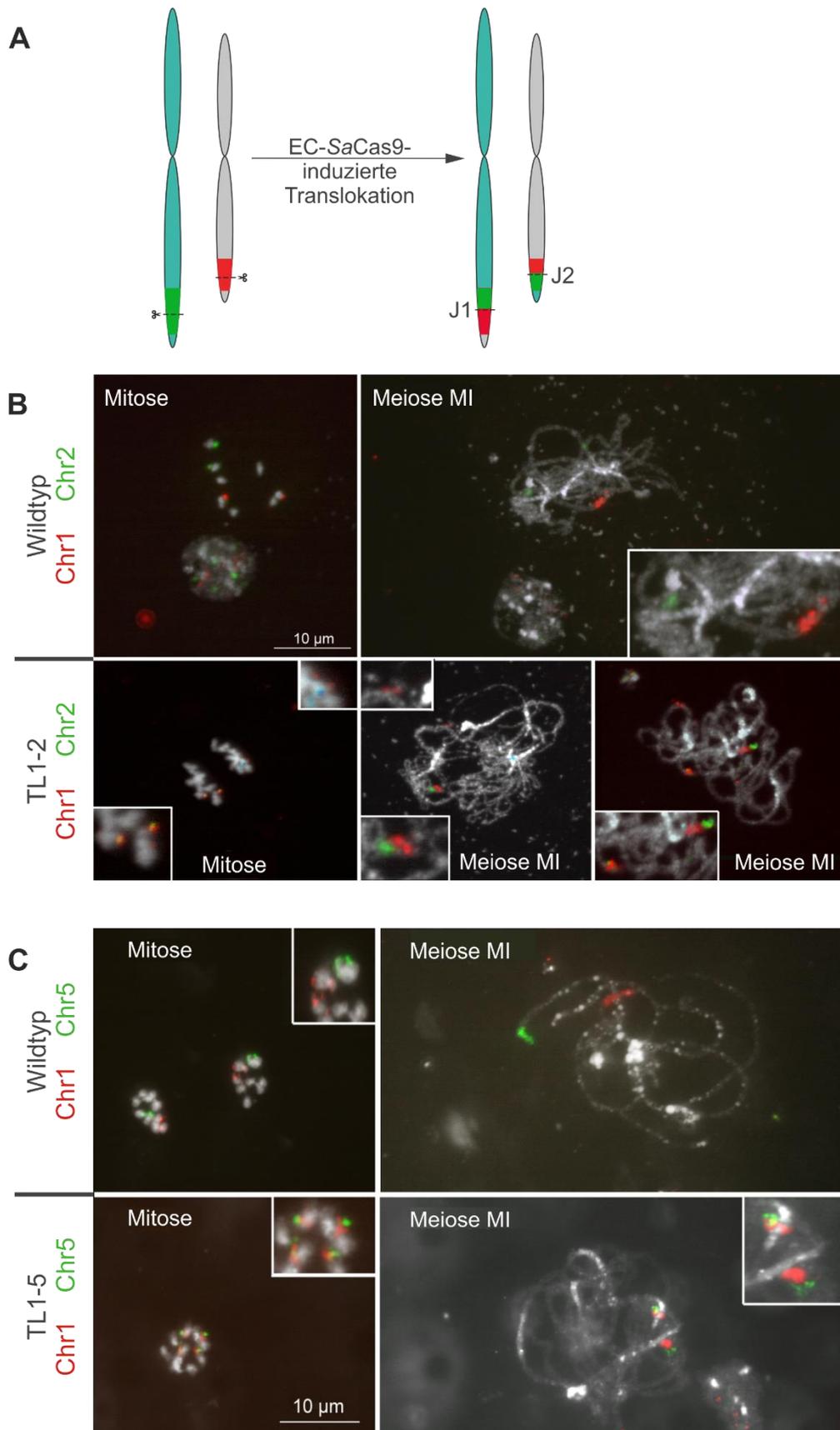


Abbildung 4-3: FISH-Analyse der etablierten Linien, die die jeweilige TL homozygot tragen.

Fortsetzung Abbildung 4-3: (A) Schema der über FISH angefärbten Chromosomen im Wildtyp und nach Ausbildung einer TL. (B+C) Mitotische und natürlich Pachytänchromosomen des Wildtyps und der TL1-2 bzw. der TL1-5 nach FISH unter Verwendung unterschiedlich markierter DNA-Sonden (BAC-Pools für TL1-2 und Oligo-basierte Farbsonden für TL1-5), die für Regionen um die Bruchstellen auf Chr1 (rot) und Chr2 bzw. Chr5 (grün) spezifisch sind. Die Einsätze zeigen weiter vergrößerte Chromosomenregionen.

4.1.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die erstmalige, erfolgreiche Induktion von reziproken Translokationen mittels des CRISPR/Cas-Systems und deren Vererbung in die nächste Generation sowie die effiziente Etablierung für die TL homozygoter Linien in Pflanzen erreicht werden. Durch die zusätzliche Aufklärung der Reparaturmechanismen, welche an der Entstehung von interchromosomalen CRs beteiligt sind, konnte ein wichtiger Beitrag in der Grundlagenforschung zu chromosomalen Umlagerungen mit einem anwendungsorientierten Blick geleistet werden.

In dieser Arbeit konnten die für intrachromosomale CRs gezeigten Ergebnisse (Schmidt *et al.*, 2019a) für die Bildung von interchromosomalen Umlagerungen bestätigt werden. Durch detaillierte Analysen der neu gebildeten Verknüpfungspunkte einer TL in den transformierten T1-Pflanzen auf Sequenzebene wurde eine Involvierung von c-NHEJ wie auch zu einem sehr kleinen Teil alt-NHEJ gezeigt. Ist die c-NHEJ beeinträchtigt, übernimmt die alt-NHEJ die TL-Bildung, wobei die Frequenz der induzierten Ereignisse signifikant ansteigt. Da in dieser Arbeit neben dem Wildtyp nur die *ku70-1* T-DNA Insertionsmutante untersucht wurde, könnten weitere Analysen in alt-NHEJ Mutanten oder auch Doppelmutanten für beide NHEJ Reparaturwege zur genaueren Aufklärung der Mechanismen hinter einer TL-Bildung beitragen.

Da die POL θ eine Schlüsselrolle im alternativen Mechanismus des NHEJ übernimmt (Kent *et al.*, 2015; Black *et al.*, 2016) und in Säugern an der Kontrolle der Häufigkeit von TL beteiligt und die Genomintegrität durch Begrenzung großer Deletionen bewahrt (Wood und Doublé, 2016), würden Untersuchungen in der Mutante des Pflanzenhomologs TEBICHI (Inagaki *et al.*, 2006; Inagaki *et al.*, 2009) die bisherigen Daten über die dahinterliegenden Mechanismen weiter ergänzen. Dabei stellt die für eine DSB-Induktion notwendige Transformation von *teb* Mutanten eine Herausforderung dar. Eine direkte Transformation der Nuklease-Konstrukte ist nicht möglich, da TEB in *Arabidopsis* für die T-DNA Integration bei einer Agrobakterien-vermittelten Transformation essentiell ist (van Kregten *et al.*, 2016). Dieses Problem könnte durch Co-Transformationen umgangen werden. Zum einen wäre eine Co-Transformation des Cas9-Expressionskonstruktes mit einem TEB-Expressionskonstrukt in den *teb*

Mutanten möglich. Durch eine zeitweilige, transiente Expression der TEB würde so die Integration der T-DNA ermöglicht werden. Zum anderen könnten auch Wildtyp Pflanzen mit dem Cas9-Expressionskonstrukt und einem *TEB*-spezifischen RNAi-Vektor co-transformiert werden, sodass in diesen Pflanzen nur eine geringe TEB-Proteinmenge vorläge. Diese Ansätze sind jedoch arbeitsaufwendig und damit zeitintensiv, da für eine Vergleichbarkeit mit den in dieser Arbeit generierten Daten zunächst eine entsprechende Anzahl an Primärtransformanten gewonnen werden muss. Zur Verringerung der Menge an TEB-Protein in den Pflanzen könnte statt der RNAi auch eine negative Komplementationslinie hergestellt werden und diese dann mit dem Cas9-Expressionskonstrukt transformiert werden. Hierbei ist jedoch die Etablierung dieser Komplementationslinie sehr aufwendig. Diese Lösungswege sind zwar alle mit einem großen Aufwand verbunden, jedoch ist eine Analyse von induzierten TLs in Pflanzen im *teb* Hintergrund denkbar. Durch diese Strategien zur Umgehung des Transformationsproblems wäre auch die Analyse von Doppelmutanten mit *teb* möglich. Interessant wäre das Ausschalten beider NHEJ-Wege, wie es zum Beispiel in einer *teb/ku70* oder einer *teb/lig4* Mutante der Fall wäre. Bei der Induktion von TL in diesen Doppelmutanten ist nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit zu erwarten, dass keine TL auftreten würden, da beide Mechanismen, die zur TL-Bildung beitragen eingeschränkt sind. Da es in Säugern wie auch Pflanzen jedoch Hinweise gibt, dass TL auch über den Mechanismus der HR gebildet werden können (Elliott *et al.*, 2005; Pacher *et al.*, 2007), könnte in solchen Doppelmutanten die TL-Induktion an Bruchstellen mit ausreichenden Homologiesequenzen zu genau vorhersagbaren Ereignissen führen. In Säugetieren wurde ebenfalls gezeigt, dass sowohl c-NHEJ als auch alt-NHEJ möglicherweise zur Bildung von CRs beitragen können (Lupski und Stankiewicz, 2005). Interessanterweise wurde die alt-NHEJ als Hauptmechanismus für die TL-Bildung in embryonalen Stammzellen der Maus identifiziert (Simsek und Jasin, 2010; Weinstock *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu werden, nicht wie in Mauszellen, TLs in menschlichen Zellen über den c-NHEJ Mechanismus erzeugt (Ghezraoui *et al.*, 2014). Diese in Säugerzellen beschriebenen Spezies-spezifische Mechanismen (Übersicht in Ghezraoui *et al.*, 2014; Brunet und Jasin, 2018) könnten auch für die Bildung von CRs in Pflanzen gelten. Deshalb sollten die Untersuchungen auch in wichtigen Kulturpflanzen wie zum Beispiel der Tomate durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auf alle Pflanzen übertragbar sind.

Die in dieser Arbeit erzielten Frequenzen gezielt induzierter TL von gut 0,1 % im Wildtyp sind ein guter Anfang, jedoch sind höhere TL-Frequenzen für eine praktikable Anwendung wünschenswert. In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung für die TL-Frequenz in *ku70-1* Mutanten nachgewiesen werden. Daher

könnte die Blockierung von c-NHEJ eine allgemeine Strategie zur Steigerung der Effizienz des CRISPR/Cas-vermittelten *Genome Engineering* in Pflanzen sein. Die DNA-Reparaturmutante *ku70-1* weist durch die essentielle Rolle von KU70 in der Genomintegrität, als Schlüsselprotein der c-NHEJ und durch die Involvierung in die Stabilität der Telomere und weiterer Prozesse, eine hohe genetische Instabilität wie Telomerdysfunktion und DNA-Reparaturdefekte auf (Bundock *et al.*, 2002; Riha *et al.*, 2002). Deshalb sollte eine Verwendung anderer Mutanten als Alternative für praktische Anwendungen in der Pflanzenzüchtung in Betracht gezogen werden. So könnte die Deletion der LIG4 ebenfalls die c-NHEJ einschränken und durch den Wechsel zum fehleranfälligeren alt-NHEJ eine Erhöhung der TL-Frequenz erreicht werden. Leider bedeutet dies, dass Reparaturergebnisse an den Verbindungsstellen von CRs in diesen Mutanten weniger vorhersehbar sind, da sich je nach Sequenzkontext unvorhergesehene Mutationen bilden können. Auch der alt-NHEJ Faktor PARP1 scheint in menschlichen Zellen in die TL-Bildung zu beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass ein PARP1-*Knockdown* und auch die PARP1-Hemmung über Olaparib beide die TL-Frequenz reduzieren (Wray *et al.*, 2013; Soni *et al.*, 2014), während eine andere Publikation gezeigt hat, dass die Überexpression von PARP1 die TL in einigen, aber nicht allen Zelllinien steigert (Torres-Ruiz *et al.*, 2017). Deshalb könnten in nachfolgenden Experimenten DNA-Reparaturmutanten für diese Faktoren auf die Erhöhung der TL-Frequenz aber auch die Reparaturmuster an den TL-*Junctions* untersucht werden.

Bei der Verwendung von DNA-Reparaturmutanten besteht jedoch immer die Gefahr unerwünschte Veränderungen an den neu verknüpften DSB-Enden einzuführen. Eine andere Strategie zur Erhöhung der TL-Frequenz wäre die eher unbeweglichen Bruchenden in räumliche Nähe zueinander zu bringen. In Säugern umfassten solche Versuche, die TL-Frequenz zu erhöhen, kurze Einzelstrang-Oligonukleotide, die mit den von CRISPR-Cas9 gebildeten DSB-Enden übereinstimmen, um das Verbinden der beiden Chromosomenenden für die Translokationsbildung zu "leiten" (Torres-Ruiz *et al.*, 2017). Mit der Möglichkeit der gleichzeitigen Anwendung von verschiedenen Cas-Orthologen für verschiedene Funktionen könnte auch das CRISPR/Cas-System hierfür eingesetzt werden (Steinert *et al.*, 2015; 2017). So könnte einerseits die Cas9-Nuklease aus *S. aureus* die DSB-Induktion vermitteln, während ein anderes Ortholog zum Beispiel aus *S. pyogenes* für die Verknüpfung der Chromosomenabschnitte miteinander verwendet wird. In solch einem *Tethering*-Ansatz (Abbildung 4-4) wird ein *deadCas9* mit zwei sgRNAs zur DNA-Bindung eingesetzt. Zum einen soll ein Abschnitt auf dem einen Chromosom in der Nähe des induzierten Bruches gebunden werden, zum anderen der abgetrennte Chromosomenabschnitt des heterologen Chromosoms. Durch den Einsatz eines Linkers

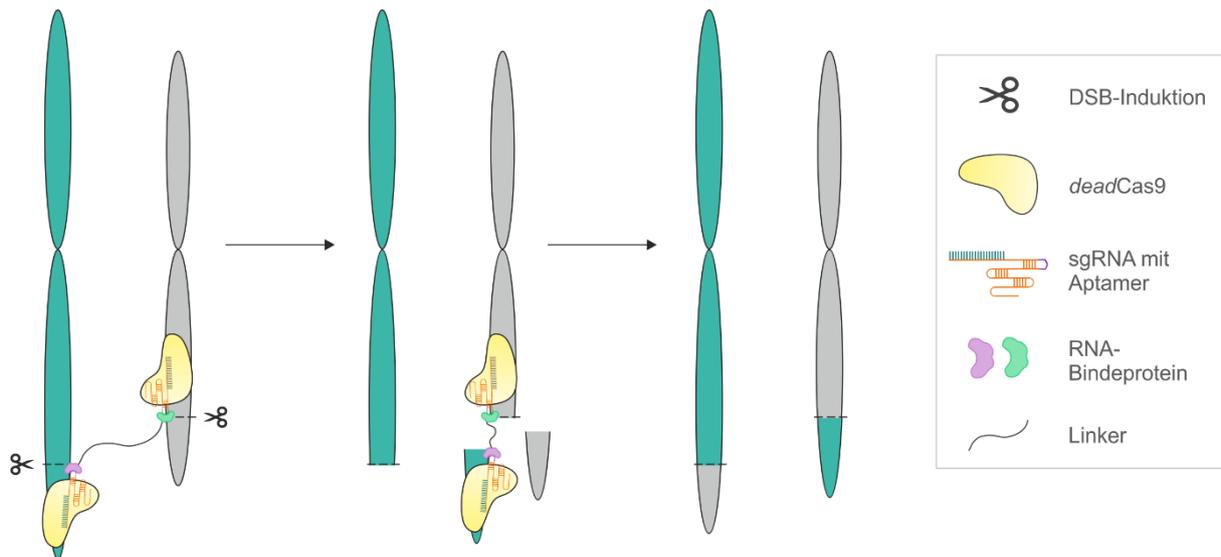


Abbildung 4-4: Schema eines Tethering-Ansatzes zur Erhöhung der TL-Frequenz.

Nach einer Induktion von zwei DSBs auf heterologen Chromosomen können die abgeschnittenen Fragmente ausgetauscht werden. Zusätzlich zum zur DSB-Induktion eingesetzten Cas-Protein wird ein *deadCas9*-Protein, aus einem anderen Organismus, für die Bindung der Chromosomen *upstream* bzw. *downstream* der Schnittstelle verwendet. An die mit einem Aptamer versehenen sgRNAs können zwei verschiedene RNA-Bindeproteine, die über einen Linker verknüpft sind, binden und dadurch die von den *deadCas9* gebundenen Fragmente in räumliche Nähe zueinander bringen. Somit wird die Wahrscheinlichkeit der TL-Bildung erhöht.

zwischen den spezifischen sgRNAs können die durch die *deadCas9* gebundenen Fragmente in räumliche Nähe gebracht werden und die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens und damit der illegitimen Verknüpfung erhöht werden.

Um das Toolkit des CRISPR/Cas-Systems im Bereich der Pflanzenzüchtung zu erweitern, können die in Säugern gewonnenen Erkenntnisse sowie die bisherigen Studien in Pflanzen und die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse genutzt werden, um Chromosomen nach individuellen Vorstellungen zu gestalten. So ist es nicht nur möglich, unerwünschte Gene und damit deren Merkmalsausprägung zu entfernen, sondern auch Kopplungsgruppen einzuführen oder aufzulösen. In vielen Nutzpflanzen treten Inversionen und Translokationen auf, die im Laufe der Evolution auf natürliche Weise im Rahmen von fehlerbehafteten Reparaturprozessen entstanden sind (Badaeva *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2012). Im Bereich der neu angeordneten Chromosomenstrukturen kommt es bei Heterozygoten zur Unterdrückung der Rekombination, ein Transfer von bestimmten QTLs oder Resistenzmarkern zwischen verschiedenen Kultursorten wird verhindert (Seah *et al.*, 2004; Drouaud *et al.*, 2006; Coughlan

und Willis, 2019). Dadurch wird die Pflanzenzüchtung erheblich beeinträchtigt, da der Austausch von genetischem Material in diesen Bereichen zwischen verschiedenen Sorten nicht möglich ist. Durch die Umkehrung einer solchen CR könnten diese Bereiche wieder für die HR zugänglich gemacht werden, sodass bestimmte Merkmale wieder übertragen werden könnten.

So können auch Translokationen zur Entkopplung beitragen. Liegen bestimmte Gene in räumlicher Nähe, ist die Wahrscheinlichkeit einer gemeinsamen Vererbung erhöht. So kann es unter anderem zum *linkage drag* kommen. Durch die Verteilung dieser Gene auf verschiedene Chromosomen mittels induzierter Translokation könnten erwünschte QTL unabhängig von den unerwünschten vererbt werden. Im Gegensatz zum Aufheben einer Kopplungsgruppe ist es auch vorstellbar eine Kopplung bestimmter Gene zu generieren, indem der gewünschte Bereich invertiert und damit von der Rekombination ausgeschlossen wird oder indem Gene, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, durch Translokation auf einem Chromosom zusammengefasst werden.

Große Variationen der Chromosomenstruktur verursachen im Allgemeinen eine Verzerrung der Chromosomensegregation und/oder eine Verringerung der Rekombination bei Hybriden. Es kann auch zur Sterilität in der Hybridgeneration kommen. Die veränderten Chromosomen können in der Meiose nur fehlerhaft paaren und es treten Fertilitätsprobleme auf (Rouen *et al.*, 2013; Fishman und Sweigart, 2018). So tragen z. B. 3-4 % der an Down-Syndrom erkrankten Menschen eine Translokation, die schon die Mutter im Genom aufweist, aber erst durch fehlerhafte Segregation eine Merkmalsausbildung herbeiführt. Deshalb wird diese Form auch Translokations-Trisomie 21 genannt (Penrose *et al.*, 1960; Wilch und Morton, 2018). In Pflanzen ist eine reduzierte Fertilität und ein verminderter Genfluss ein Nachteil für die Züchtung. Jedoch lassen sich einige Arten vegetativ vermehren, sodass diese Eigenschaft in der Domestizierung dieser Kultursorten zum Vorteil genutzt werden kann. Aufgrund der durch eine Translokation bedingten Sterilität werden oftmals keine Samen gebildet, die Früchte sind kernlos (Martin *et al.*, 2017) und werden von Konsumenten bevorzugt gekauft. Wie schon erwähnt, spielen große Umstrukturierungen des Genoms eine wichtige Rolle in der Evolution. Durch die spontane Ausbildung von verschiedenen Inversionen und Translokationen entstehen Reproduktionsbarrieren und damit neue Arten. Auch kann die Anzahl an Chromosomen vergrößert oder verkleinert werden. Diese Vorgänge konnten in vielen Pflanzenfamilien wie *Brassicaceae* und *Triticaceae* mittels komparativer Studien nachvollzogen werden (Blanc *et al.*, 2000; Lysak *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2016b). Interessant wäre zusätzlich, diese Prozesse nachzuahmen, umzukehren oder selbst neue Arten zu generieren.

4.2 SSB-induzierte Homologe Rekombination unterscheidet sich von der DSB-induzierten HR

Die spezifische Induktion eines DSBs stellt für verschiedenste Anwendungen in der Grünen Biotechnologie einen wichtigen, initialen Schritt dar. Deshalb konzentrierte sich bisher eine enorme Anzahl von Studien auf die Analyse der Reparatur von DSBs in Eukaryoten. Im Gegensatz dazu befassten sich nur wenige Studien mit der Frage, wie Einzelstrangbrüche in eukaryotischen Genomen repariert werden (Maizels und Davis, 2018; Adamčík *et al.*, 2013). SSBs entstehen oftmals als Intermediate in der DNA-Replikation oder bei der Reparatur innerhalb der Mechanismen der Basen- und Nukleotid-Exzisionsreparatur (BER/NER) (Roldán-Arjona *et al.*, 2019). Pflanzen sind aufgrund ihres sessilen und autotrophen Lebensstil einer ständigen Bedrohung ihrer Genomintegrität durch schädliche UV-Strahlung ausgesetzt. Ein häufig auftretender DNA-Schaden, der durch UV-Licht verursacht wird, ist die Dimerisierung von Pyrimidinbasen. Neben der Reparatur über Photolyasen ist NER der Hauptweg zur Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden in Pflanzen (Molinier, 2017). Obwohl aufgrund dieser Tatsachen SSBs unter natürlichen Bedingungen um einige Größenordnungen häufiger als DSBs im Genom auftreten (Cao *et al.*, 2019), ist bisher nur wenig über die SSB-induzierten Reparaturmechanismen bekannt. Dies war nicht nur dem fehlenden Interesse, sondern auch der Tatsache geschuldet, dass die Verfügbarkeit der Werkzeuge zur Induktion von SSBs bis vor wenigen Jahren begrenzt war (Kim *et al.*, 2012; Metzger *et al.*, 2013; Katz *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015). Mit der Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems und der damit entstandenen Möglichkeit, eine sequenzspezifische Nickase aus der Cas9-Nuklease herzustellen, indem eine Punktmutation in das aktive Zentrum einer der beiden Nuklease-Domänen eingeführt wurde (Mali *et al.*, 2013), können SSBs nun zielgerichtet an nahezu jeder Position im Genom induziert werden. Seither wurde eine Reihe von Studien zur Anwendung dieser Nickase durchgeführt, jedoch befassen sich nur wenige mit der Frage, wie SSBs repariert werden (Vriend *et al.*, 2014; Vriend *et al.*, 2016; Bothmer *et al.*, 2017). In den meisten Fällen werden SSBs einfach re-ligiert. SSBs können jedoch auch in den schwerwiegenderen Schaden eines DSB umgewandelt werden. Dies kann beim Auftreten zweier SSBs in unmittelbarer Nähe passieren oder während der DNA-Replikation, wenn vor der Ligation des SSB die Replikationsgabel auf den Schaden trifft (Saleh-Gohari *et al.*, 2005). Die DSBs wiederum werden hauptsächlich durch klassisches oder alternatives NHEJ repariert, was häufig zu Mutationen an der Bruchstelle führt. DSBs können nicht nur über NHEJ, sondern auch in geringerem Maße über HR repariert werden. Auch SSBs können die HR direkt initiieren (Strathern *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2004; McConnell Smith *et al.*, 2009; Metzger *et al.*, 2011). Interessanterweise wurden für Säugetierzellen widersprüchliche Ergebnisse

veröffentlicht, welche Faktoren an SSB-induzierter HR beteiligt sind. Auf der einen Seite konnte eine Involvierung der klassischen HR-Faktoren, die an der DSB-Reparatur beteiligt sind, gezeigt werden, andererseits wurden von Schlüsselfaktoren der DSB-induzierten HR unabhängige Modelle vorgeschlagen (Davis und Maizels, 2014; Vriend *et al.*, 2016; Nakajima *et al.*, 2018).

Auch in Pflanzen kann ein SSB mittels HR repariert werden. Mit der Cas9-Nickase konnte gezeigt werden, dass in der Modellpflanze *Arabidopsis* die Induktion eines einzelnen SSB kaum mutagen ist, gleichzeitig aber die HR zwischen intrachromosomalen Wiederholungen stark erhöht ist (Fauser *et al.*, 2014). Hierbei wurde sogar eine erhöhte Frequenz der HR nach Bruchinduktion durch die Nickase im Vergleich zur Nuklease aus *S. pyogenes* festgestellt. Im genauen Gegenteil dazu konnten Wolter *et al.* (2018) zeigen, dass die SaCas9-Nuklease im Vergleich zu ihrer orthologen Nickase eine höhere HR-Rate induziert. Insgesamt wurde nach SSB-Induktion mit der SpCas9-D10A in den Reporterkonstrukten die höchste HR-Rate nachgewiesen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte getestet werden, ob die klassische Reparaturmaschinerie der HR-vermittelten DSB-Reparatur auch an der SSB-Reparatur mithilfe von Homologien beteiligt ist. Dabei fiel im Unterschied zum ersten Teil dieser Arbeit die Wahl auf das Cas9-Ortholog aus *Streptococcus pyogenes* zur Bruchinduktion, da für diese Variante die höchste HR-Induktion gemessen werden konnte (Wolter *et al.*, 2018).

4.2.1 Die DNA-Reparaturfaktoren AtRAD54 und AtRAD5A sind nicht an der SSB-induzierten HR beteiligt

Der Mechanismus des DSB-induzierten GTs in Pflanzenzellen wurde schon vor geraumer Zeit aufgeklärt (Puchta, 1998). Er wird am besten durch den SDSA-Mechanismus der HR beschrieben (Kapitel 1.1.1.2). Ein weiterer Weg der HR in Pflanzen ist das SSA, welches in somatischen Pflanzenzellen der häufigste ist, jedoch als einziger zur nicht-konservativen HR zählt. Durch die Verwendung von transgenen Rekombinationssubstraten mit unterschiedlichen Aufbauten ist es möglich, *in planta* die Rolle verschiedener Faktoren in diesen beiden Wegen der HR zu charakterisieren. In diesen Reparaturweg-spezifischen Reporterkonstrukten kann ein Bruch durch die Expression einer Sequenz-spezifischen Nuklease induziert werden, was zur Wiederherstellung eines Markers durch SSA (DGU.US Linie) oder SDSA bzw. Genkonversion (IU.GUS Linie) führt (Orel *et al.*, 2003). Mithilfe dieser verschiedenen Reporterlinien zum Nachweis intrachromosomaler Rekombination wurde bereits demonstriert, dass die DSB-Reparatur mittels HR unter anderem von dem klassischen HR-Faktor RAD54 abhängt, der den Strangaustausch katalysiert. Neben einer Mutation des RAD54-Gens führt

auch das Ausschalten von *AtRAD5A* zu einer starken Verringerung der Rekombination in IU.GUS-Reporterlinien (Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). Es wird dabei angenommen, dass die DNA-Translokase RAD5A, die in die Reparatur verschiedenster DNA-Schäden involviert ist (Chen *et al.*, 2008; Klemm *et al.*, 2017), normalerweise die Prozessierung der DNA-Reparaturintermediate über einen Strangwechsel katalysieren kann.

Da die SWI2/SNF2 ATPasen RAD54 und RAD5A somit in die Reparatur eines DSB über Homologien involviert sind, wurden die Mutantenlinien beider Gene im Rahmen dieser Arbeit in Hinblick auf die HR-vermittelte SSB-Reparatur untersucht. Dabei konnte nach SSB-Induktion sowohl für *rad54-1* wie auch für *rad5a-2* in beiden Reporterhintergründen keine Reduktion der HR-Rate im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden und damit auch keine Beteiligung der Proteine an der SSB-induzierten Rekombination gezeigt werden. In vorherigen Studien konnte in den beiden Mutanten im DGU.US Reporterhintergrund ebenfalls eine dem Wildtyp entsprechende HR-Induktion nach einem DSB gezeigt werden (Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). Damit spielen beide ATPasen weder nach DSB- noch nach SSB-Induktion eine Rolle im SSA-Weg der intrachromosomalen HR. Bei den zuvor durchgeführten Untersuchungen weiterer Linien konnten keine Faktoren identifiziert werden, deren Verlust die Reparatur mittels SSA stark beeinflussen würde. Der Mechanismus der SSA ist recht simpel, weshalb erforderliche Funktionen redundant vorhanden sein könnten. So können sich andere Nukleasen und Helikasen möglicherweise gegenseitig ersetzen, was den Nachweis von Schlüsselfaktoren im SSA-Mechanismus erschwert. Die Tatsache, dass mit der IU.GUS-Reporterlinie in beiden Mutantenhintergründen nach SSB-Induktion nicht dieselbe Reduktion der HR-Rate erzielt wurde wie nach DSB-Induktion, zeigt deutlich, dass die SSB-Reparatur über einen anderen Mechanismus erfolgt. Abbildung 4-5 zeigt ein Modell nach dem eine SSB-induzierte Reparatur der Rekombinationssubstrate ablaufen könnte. Nach dem induzierten SSB könnte es ausgehend vom 5'-Ende zur Resektion des Einzelstranges kommen. Dadurch werden im DGU.US Reporter *upstream* des Bruches Homologien freigelegt und das freie 3'-Ende kann dort binden (Abbildung 4-5 A, links). Da in beiden Reporterkonstrukten die Homologien intrachromosomal in unmittelbarer Nähe zur Schnittstelle der Nickase lokalisiert sind, ist es womöglich nicht nötig, dass das 3'-Ende zu einem langen Einzelstrang prozessiert wird, der dann über einen längeren Homologiebereich an die homologe DNA-Sequenz bindet. So wäre eine MH-vermittelte Bindung ähnlich des Mechanismus der alt-NHEJ auch über eine RAD54-unabhängige Stranginvasion möglich, wenn das 5'-Ende nicht abgebaut wurde (Abbildung 4-5 A, rechts). Da die Auflösung der MH-vermittelten Bindungen im DGU.US Hintergrund wieder zur Ausbildung der ursprünglichen Sequenz führen würde, sind in diesem Reparaturweg wahrscheinlich keine Translokasen oder Helikasen notwendig, somit auch nicht RAD5A.

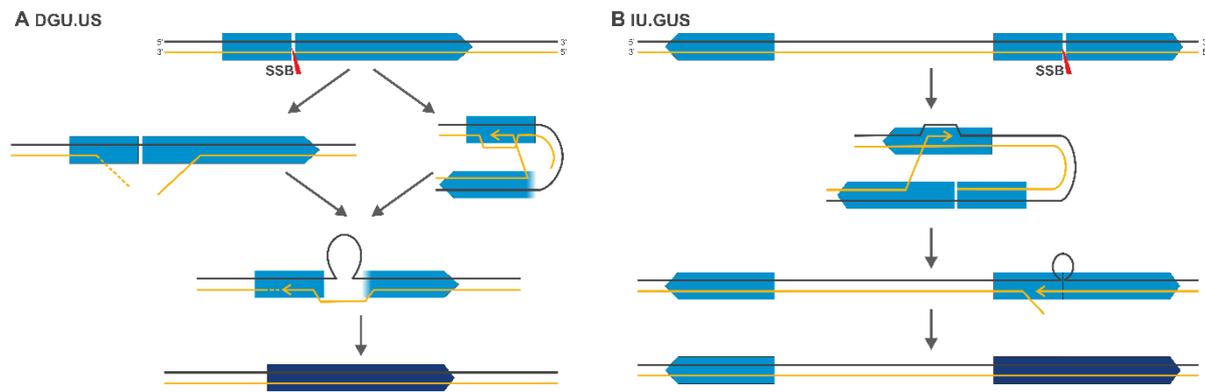


Abbildung 4-5: Modelle für die SSB-induzierte HR in den Reporterkonstrukten DGU.US und IU.GUS.

(A) Nach dem SSB kann es zum Abbau des Stranges ausgehend vom 5'-Ende kommen, sodass Homologien zum anderen Bruchende freigelegt werden, woran dieses 3'-Ende binden kann. Auch die direkte Invasion des 3'-Endes in den homologen Bereich und die Bindung über MHs ist möglich. Dadurch entsteht beides Mal eine schleifenförmige Struktur, die die inserierte Verdoppelung des *GUS*-ORF enthält. Mit der Entfernung dieser Struktur kann die *GUS*-Sequenz restauriert werden. (B) Auch im IU.GUS Reporter kann es zur Einwanderung des nach SSB-Induktion freien 3'-Endes in den homologen Bereich *upstream* der Bruchstelle kommen. Nach Verlängerung des Stranges kann dieser den Bereich direkt auf der anderen Seite der Bruchstelle binden. Dabei kommt es auch hier zur Ausbildung einer schleifenartigen Struktur, die die kurze Unterbrechung des *GUS*-ORF enthält. Durch Entfernung der Schleife kommt es hier ebenfalls zur Restaurierung des Reportergens.

Auch im IU.GUS Substrat könnte die Bindung an die zum ORF des unterbrochenen *GUS*-Gens invertiert liegende Homologie über einen MH-initiierten Vorgang ähnlich der alt-NHEJ vermittelt werden (Abbildung 4-5 B). Damit wäre für die Stranginvasion im Gegensatz zur klassischen HR nur ein kurzer Einzelstrang notwendig.

Somit konnte in dieser Arbeit klar gezeigt werden, dass es große Unterschiede zwischen der SSB- und DSB-induzierten HR zwischen intrachromosomalen Homologien gibt.

4.2.2 Ausblick

Beim *Gene targeting* wird der dem Organismus intrinsic Mechanismus der HR genutzt, um gewünschte Änderungen präzise und zielgerichtet einzuführen. Aufgrund des Mangels an zufriedenstellenden Frequenzen dieser Methode wurden viele Versuche unternommen, um die GT-Frequenzen in Pflanzen auf die eine oder andere Weise zu erhöhen (zur Übersicht siehe Puchta und Fauser, 2013; Steinert *et al.*, 2016; Wolter *et al.*, 2018; Huang und Puchta, 2019; Sun *et al.*, 2016).

Eine Anwendung der Cas9-Nickase im GT zur Bruchinduktion als Alternative zu einer Nuklease ist attraktiv, da ein SSB nicht mutagen ist und so unerwünschte Veränderungen an der Zielsequenz verringert werden können. Die Folge daraus ist, dass die sgRNA Zielsequenz für die Nickase erneut zur Verfügung steht, wohingegen nach DSB-Induktion durch NHEJ eingefügte Mutationen eine weitere Erkennung der Zielsequenz verhindern. So erhöht sich im Fall der Nickase durch den Zyklus der Bruchinduktion und präzisen Reparatur die Wahrscheinlichkeit der HR, da erst ein solches Ereignis durch die Veränderung der Erkennungssequenz einen stabilen Zustand beschreibt. Die Aufklärung der Mechanismen, die einer SSB-induzierten HR zugrunde liegen, können einen Beitrag zu einem Ansatz zur Erhöhung der GT-Effizienzen leisten. Überraschenderweise wurde jedoch bei der Anwendung der Cas9-Nickase für das GT trotz der zuvor gezeigten hohen HR-Rate festgestellt, dass SSBs bei der Förderung der HR-Reaktion zwischen einem chromosomalen DSB und einem extrachromosomalen DNA-Fragment bei weitem weniger effizient sind als DSBs (Wolter *et al.*, 2018). Diese Reduktion in der Effizienz könnte auf die Involvierung verschiedener Mechanismen der DSB-induzierten und SSB-induzierten HR zurückzuführen sein. So könnte ein Grund sein, dass wie in der vorliegenden Arbeit bestätigt, die HR nach einem SSB nicht über eine klassische Stranginvasion initiiert wird. Bei der Verwendung eines extrachromosomalen *Templates* könnten die langen Homologien für die Bindung essentiell sein und MHs nicht ausreichen. Damit ist das im *in planta* GT bereitgestellte Reparatur-*Template* möglicherweise nicht zugänglich. In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass SSB-induzierte HR mit einzelsträngigen DNA-Stücken als Donor oder auch beim Einfügen eines SSB in das als *Template* verwendete Plasmid RAD51-unabhängig ist (Davis und Maizels, 2016; Nakajima *et al.*, 2018). Wolter *et al.* (2018) konnten jedoch auch durch die Induktion zweier SSBs beidseitig des homologen *Templates* keine erhöhte GT-Frequenz induzieren. Der Grund könnte sein, dass die induzierten SSBs immer wieder direkt ligiert werden und es kaum zu einer Freisetzung eines einzelsträngigen DNA-Moleküls kommt. Durch eine Mutation von Reparaturfaktoren involviert in die SSB-Reparatur, wie PARP1 oder XRCC1, wäre es möglich diese Re-Ligation herunter zu regeln und damit möglicherweise die HR-Rate zu erhöhen.

Dass weder RAD54 noch RAD5A für die Homologie-vermittelte SSB-Reparatur erforderlich sind, zeigt, dass sich der Mechanismus für DSB- und SSB-induzierte HR in Pflanzen drastisch unterscheidet. Mit der weiteren Aufklärung der der SSB-induzierten HR zugrundeliegenden Mechanismen könnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden, die eine effiziente Applikation der Cas9-Nickase im GT ermöglichen. Für die praktische Anwendung ist hauptsächlich die SDSA-vermittelte HR relevant, weshalb sich weitere Experimente auf die Untersuchungen in IU.GUS-Hintergrund konzentrieren könnten. Dabei wäre es interessant, verschiedene Helikase- und Nuklease-Mutanten zu untersuchen,

da diese nach dem in dieser Arbeit neu aufgestellten Modell in die SSB-induzierte HR involviert sein könnten. Hier würde unter anderem FANCM, RECQ4A oder MUS81 in Frage kommen, für die alle eine Involvierung in die SDSA-vermittelte HR nach DSB-Induktion nachgewiesen wurde (Mannuss *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind die ersten Schritte in Richtung eines grundlegenden Verständnisses der SSB-induzierten HR. Mit der Durchführung weiterer Experimente, wie der hier beschriebenen, kann ein nächster Schritt zur Aufklärung getan werden. Damit können über die Grundlagenforschung wertvolle Erkenntnisse für die praktische Anwendung in der Grünen Gentechnologie gewonnen werden.

5 Zusammenfassung

Das äußerst versatile CRISPR/Cas-System lässt sich in Pflanzen zur Induktion von Veränderungen einzelner Merkmale im Rahmen des *Gene Engineering* aber auch von Veränderungen in genomischen Maßstab im Rahmen des *Genome Engineering* einsetzen. Hier wird nach Bruchinduktion der den Pflanzen eigene Reparaturmechanismus ausgenutzt, um Veränderungen einzuführen. Das Verständnis der dahinterliegenden Mechanismen kann zusätzlich zu einer Erweiterung und Effizienzsteigerung sowie der genauen Vorhersage des Ergebnisses beitragen. Diese Mechanismen sind jedoch oftmals nicht aufgeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal in Pflanzen ein gezielter Austausch von Chromosomenfragmenten zwischen heterologen Chromosomen erzielt werden. Zusätzlich wurde eine Methode zur effizienten Erzeugung vererbbarer Translokationen (TL) etabliert. Durch die gezielte Induktion zweier DSBs mit der *SaCas9*-Nuklease auf den Chr1 und Chr2 von *Arabidopsis thaliana* wurden TL-Frequenzen von 0,01 % im Wildtyp erreicht. Bei der Analyse der TL-*Junctions* auf Sequenzebene wurde gezeigt, dass unter natürlichen Bedingungen TL über den c-NHEJ Mechanismus gebildet werden. Dabei wird ein Großteil der neu gebildeten Verknüpfungen fehlerfrei ligiert. Wird dieser Weg ausgeschaltet, konnte ein Anstieg der TL-Rate um das Fünffache beobachtet werden. Wobei in Abwesenheit von KU70 der fehleranfällige Weg der alt-NHEJ übernimmt. Mit dem Einsatz des EC-Promotors und der Anwendung eines effizienten Protokolls konnten die TL-Ereignisse in die nächste Generation gebracht und Linien homozygot für die TL zwischen Chr1 und Chr2 sowie Chr1 und Chr5 etabliert werden. Durch molekulare sowie zytologische Analysen wurde ein konservativer und reziproker Austausch der Chromosomenabschnitte für beide Ansätze bestätigt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die SSB-induzierte HR genauer analysiert. Dafür wurden zwei Reporterlinien eingesetzt, über die eine HR mittels SSA oder dem SDSA Mechanismus nachgewiesen werden kann. Bei der Untersuchung der beiden DNA-Reparaturmutanten *rad54-1* und *rad5a-2* konnte keine Reduktion der HR-Frequenz im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Damit sind beide Faktoren nicht in die SSB-induzierte HR involviert, was im starken Kontrast zur DSB-induzierten HR steht. Das in dieser Arbeit vorgeschlagene Modell basiert daher nicht auf der klassischen Stranginvasion, sondern auf einer MH-initiierten Einwanderung in den homologen Bereich ähnlich des Mechanismus der alt-NHEJ.

6 Summary

The extremely versatile CRISPR/Cas system can be used in plants as part of gene engineering to induce changes in individual traits but also for genome engineering to induce changes on a genomic scale. After break induction, the plant's own repair mechanism is used to introduce the modifications. Elucidating the underlying mechanisms can contribute to a diversification of the system and an increase in efficiency as well as the precise prediction of the result. However, these mechanisms are often not well understood.

Within the scope of this work, a targeted exchange of chromosome fragments between heterologous chromosomes could be achieved for the first time in plants. In addition, a method for the efficient generation of heritable translocations (TL) was established. With the targeted induction of two DSBs with the *Sa*Cas9 nuclease on chromosome 1 and chromosome 2 of *Arabidopsis thaliana*, TL frequencies of 0.01% were achieved in the wild type. By analysing the TL junctions at the sequence level, it was shown that under natural conditions TL are formed via the c-NHEJ mechanism. The majority of the newly formed junctions are ligated error-free. If this path is switched off, a five-fold increase in the TL rate was observed. In the absence of KU70 the error-prone pathway of alt-NHEJ takes over. With the use of the egg cell promoter and the application of an efficient protocol, the TL events could be brought into the next generation and lines could be established homozygously for the TL between chromosome 1 and chromosome 2 as well as between chromosome 1 and chromosome 5. A conservative and reciprocal exchange of the chromosome sections for both approaches was confirmed by molecular and cytological analyses.

In the second part of this work, SSB-induced HR was analysed in more detail. Two reporter lines were used for this, via which a HR reaction can be detected using SSA or the SDSA mechanism. When the two DNA repair mutants *rad54-1* and *rad5a-2* were examined, no reduction in HR frequency compared to the wild type was observed. Both factors are therefore not involved in the SSB-induced HR, which is in stark contrast to the DSB-induced HR. The model proposed in this work is therefore not based on the classic strand invasion, but on a MH-mediated immigration of the single strand into the homologous area similar to the mechanism of alt-NHEJ.

7 Referenzen

- Abeyasinghe, S. S.; Chuzhanova, N. und Cooper, D. N.** (2006). Gross deletions and translocations in human genetic disease. *Genome Dyn.* 1, 17–34.
- Abraham, R. T.** (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15(17), 2177–2196.
- Adamčík, L.; Duda, M.; Skrovina, M. und Jínek, T.** (2013). Komplikace a rizika chirurgie nádorů horní části zažívacího traktu (Foregut) II. část: Žaludek. *Rozhl Chir.* 92(9), 530–537.
- Ahmad, A.; Robinson, A. R.; Duensing, A.; van Drunen, E.; Beverloo, H. B.; Weisberg, D. B.; Hasty, P.; Hoeijmakers, J. H. J. und Niedernhofer, L. J.** (2008). ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 28(16), 5082–5092.
- Allen, E.; Xie, Z.; Gustafson, A. M.; Sung, G.-H.; Spatafora, J. W. und Carrington, J. C.** (2004). Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 36(12), 1282–1290.
- 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.; Gadrinab, 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. und Ecker, J. R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 301(5633), 653–657.
- Amiard, S.; White, C. und Gallego, M. E.** (2011). Recombination proteins and telomere stability in plants. *Curr Protein Pept Sci.* 12(2), 84–92.
- 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. und 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. und Pâques, F.** (2007). Engineered I-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 371(1), 49–65.

-
- Aten, J. A.; Stap, J.; Krawczyk, P. M.; van Oven, C. H.; Hoebe, R. A.; Essers, J. und Kanaar, R.** (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science*. 303(5654), 92–95.
- Audebert, M.; Salles, B. und Calsou, P.** (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.* 279(53), 55117–55126.
- Aymard, F.; Aguirrebengoa, M.; Guillou, E.; Javierre, B. M.; Bugler, B.; Arnould, C.; Rocher, V.; Iacovoni, J. S.; Biernacka, A.; Skrzypczak, M.; Ginalski, K.; Rowicka, M.; Fraser, P. und Legube, G.** (2017). Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24(4), 353–361.
- Babiychuk, E.; Cottrill, P. B.; Storozhenko, S.; Fuangthong, M.; Chen, Y.; O'Farrell, M. K.; van Montagu, M.; Inzé, D. und Kushnir, S.** (1998). Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases. *Plant J.* 15(5), 635–645.
- Badaeva, E. D.; Dedkova, O. S.; Gay, G.; Pukhalskyi, V. A.; Zelenin, A. V.; Bernard, S. und Bernard, M.** (2007). Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*. 50(10), 907–926.
- Barbouti, A.; Stankiewicz, P.; Nusbaum, C.; Cuomo, C.; Cook, A.; Höglund, M.; Johansson, B.; Hagemeyer, A.; Park, S.-S.; Mitelman, F.; Lupski, J. R. und Fioretos, T.** (2004). The breakpoint region of the most common isochromosome, i(17q), in human neoplasia is characterized by a complex genomic architecture with large, palindromic, low-copy repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 74(1), 1–10.
- Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D. A. und Horvath, P.** (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 315(5819), 1709–1712.
- Batty, D. P. und Wood, R. D.** (2000). Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene*. 241(2), 193–204.
- Bebenek, K.; Pedersen, L. C. und Kunkel, T. A.** (2014). Structure-function studies of DNA polymerase λ . *Biochemistry*. 53(17), 2781–2792.
- Bernard, P. und 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.
- Bétermier, M.; Bertrand, P. und Lopez, B. S.** (2014). Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet.* 10(1), e1004086.

-
- Bizard, A. H. und Hickson, I. D.** (2014). The dissolution of double Holliday junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(7), a016477.
- Black, S. J.; Kashkina, E.; Kent, T. und Pomerantz, R. T.** (2016). DNA Polymerase θ : A Unique Multifunctional End-Joining Machine. *Genes (Basel).* 7(9), 67.
- Blanc, G.; Barakat, A.; Guyot, R.; Cooke, R. und Delseny, M.** (2000). Extensive Duplication and Reshuffling in the Arabidopsis Genome. *Plant Cell.* 12(7), 1093–1102.
- Blasco, R. B.; Karaca, E.; Ambrogio, C.; Cheong, T.-C.; Karayol, E.; Minero, V. G.; Voena, C. und Chiarle, R.** (2014). Simple and rapid in vivo generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Cell Rep.* 9(4), 1219–1227.
- Bleuyard, J.-Y.; Gallego, M. E. und White, C. I.** (2006). Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA Repair (Amst.).* 5(1), 1–12.
- Boboila, C.; Alt, F. W. und Schwer, B.** (2012). Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv Immunol.* 116, 1–49.
- Boch, J.; Scholze, H.; Schornack, S.; Landgraf, A.; Hahn, S.; Kay, S.; Lahaye, T.; Nickstadt, A. und 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. und Ehrlich, S. D.** (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 151(8), 2551–2561.
- Bonas, U.; Stall, R. E. und Staskawicz, B.** (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* 218(1), 127–136.
- Bonnet, S.; Knoll, A.; Hartung, F. und Puchta, H.** (2013). Different functions for the domains of the Arabidopsis thaliana RMI1 protein in DNA cross-link repair, somatic and meiotic recombination. *Nucleic Acids Res.* 41(20), 9349–9360.
- Bothmer, A.; Phadke, T.; Barrera, L. A.; Margulies, C. M.; Lee, C. S.; Buquicchio, F.; Moss, S.; Abdulkerim, H. S.; Selleck, W.; Jayaram, H.; Myer, V. E. und Cotta-Ramusino, C.** (2017). Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus. *Nat Commun.* 8, 13905.
- Branco, M. R. und Pombo, A.** (2006). Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol.* 4(5), e138.
- Britt, A. B.** (1996). DNA Damage And Repair In Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47, 75–100.

-
- Brooks, C.; Nekrasov, V.; Lippman, Z. B. und 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.
- Brouwer, I.; Sitters, G.; Candelli, A.; Heerema, S. J.; Heller, I.; Melo, A. J. de; Zhang, H.; Normanno, D.; Modesti, M.; Peterman, E. J. G. und Wuite, G. J. L.** (2016). Sliding sleeves of XRCC4-XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA. *Nature.* 535(7613), 566–569.
- Brunet, E. und Jasin, M.** (2018). Induction of Chromosomal Translocations with CRISPR-Cas9 and Other Nucleases: Understanding the Repair Mechanisms That Give Rise to Translocations. *Adv Exp Med Biol.* 1044, 15–25.
- Brunet, E.; Simsek, D.; Tomishima, M.; DeKolver, R.; Choi, V. M.; Gregory, P.; Urnov, F.; Weinstock, D. M. und Jasin, M.** (2009). Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(26), 10620–10625.
- Budzowska, M. und Kanaar, R.** (2009). Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell Biochem Biophys.* 53(1), 17–31.
- Bundock, P.; van Attikum, H. und Hooykaas, P.** (2002). Increased telomere length and hypersensitivity to DNA damaging agents in an Arabidopsis KU70 mutant. *Nucleic Acids Res.* 30(15), 3395–3400.
- Bunting, S. F. und Nussenzweig, A.** (2013). End-joining, translocations and cancer. *Nat Rev Cancer.* 13(7), 443–454.
- Canturk, F.; Karaman, M.; Selby, C. P.; Kemp, M. G.; Kulaksiz-Erkmen, G.; Hu, J.; Li, W.; Lindsey-Boltz, L. A. und Sancar, A.** (2016). Nucleotide excision repair by dual incisions in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113(17), 4706–4710.
- Canver, M. C.; Bauer, D. E.; Dass, A.; Yien, Y. Y.; Chung, J.; Masuda, T.; Maeda, T.; Paw, B. H. und Orkin, S. H.** (2014). Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 289(31), 21312–21324.
- Cao, H.; Salazar-García, L.; Gao, F.; Wahlestedt, T.; Wu, C.-L.; Han, X.; Cai, Y.; Xu, D.; Wang, F.; Tang, L.; Ricciardi, N.; Cai, D.; Wang, H.; Chin, M. P. S.; Timmons, J. A.; Wahlestedt, C. und Kapranov, P.** (2019). Novel approach reveals genomic landscapes of single-strand DNA breaks with nucleotide resolution in human cells. *Nat Commun.* 10(1), 5799.
- Cary, R. B.; Peterson, S. R.; Wang, J.; Bear, D. G.; Bradbury, E. M. und Chen, D. J.** (1997). DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(9), 4267–4272.

-
- Ceccaldi, R.; Liu, J. C.; Amunugama, R.; Hajdu, I.; Primack, B.; Petalcorin, M. I. R.; O'Connor, K. W.; Konstantinopoulos, P. A.; Elledge, S. J.; Boulton, S. J.; Yusufzai, T. und D'Andrea, A. D.** (2015). Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol θ -mediated repair. *Nature*. 518(7538), 258–262.
- Ceccaldi, R.; Rondinelli, B. und D'Andrea, A. D.** (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 26(1), 52–64.
- Čermák, T.; Curtin, S. J.; Gil-Humanes, J.; Čegan, R.; Kono, T. J. Y.; Konečná, E.; Belanto, J. J.; Starker, C. G.; Mathre, J. W.; Greenstein, R. L. und Voytas, D. F.** (2017). A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *Plant Cell.* 29(6), 1196–1217.
- Chang, H. H. Y.; Pannunzio, N. R.; Adachi, N. und Lieber, M. R.** (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18(8), 495–506.
- Charbonnel, C.; Gallego, M. E. und 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, I.-P.; Mannuss, A.; Orel, N.; Heitzeberg, F. und Puchta, H.** (2008). A homolog of ScRAD5 is involved in DNA repair and homologous recombination in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146(4), 1786–1796.
- Cheong, T.-C.; Blasco, R. B. und Chiarle, R.** (2018). The CRISPR/Cas9 System as a Tool to Engineer Chromosomal Translocation In Vivo. *Adv Exp Med Biol.* 1044, 39–48.
- Cho, N. W.; Dilley, R. L.; Lampson, M. A. und Greenberg, R. A.** (2014). Interchromosomal homology searches drive directional ALT telomere movement and synapsis. *Cell.* 159(1), 108–121.
- Choi, P. S. und Meyerson, M.** (2014). Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun.* 5, 3728.
- Clark, K. A. und Krysan, P. J.** (2010). Chromosomal translocations are a common phenomenon in Arabidopsis thaliana T-DNA insertion lines. *Plant J.* 64(6), 990–1001.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16(6), 735–743.
- Cong, L.; Ran, F. A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P. D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L. A. und Zhang, F.** (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339(6121), 819–823.
- Cornu, T. I. und 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. und 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.
- Coughlan, J. M. und Willis, J. H.** (2019). Dissecting the role of a large chromosomal inversion in life history divergence throughout the *Mimulus guttatus* species complex. *Mol Ecol.* 28(6), 1343–1357.
- Datta, K.; Neumann, R. D. und Winters, T. A.** (2005). Characterization of complex apurinic/apyrimidinic-site clustering associated with an authentic site-specific radiation-induced DNA double-strand break. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(30), 10569–10574.
- Davis, L. und 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), E924-32.
- Davis, L. und Maizels, N.** (2016). Two Distinct Pathways Support Gene Correction by Single-Stranded Donors at DNA Nicks. *Cell Rep.* 17(7), 1872–1881.
- Deng, S. K.; Gibb, B.; Almeida, M. J. de; Greene, E. C. und Symington, L. S.** (2014). RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21(4), 405–412.
- DiCarlo, J. E.; Norville, J. E.; Mali, P.; Rios, X.; Aach, J. und Church, G. M.** (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 41(7), 4336–4343.
- Dickey, J. S.; Redon, C. E.; Nakamura, A. J.; Baird, B. J.; Sedelnikova, O. A. und Bonner, W. M.** (2009). H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma.* 118(6), 683–692.
- Dickinson, D. J.; Ward, J. D.; Reiner, D. J. und Goldstein, B.** (2013). Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods.* 10(10), 1028–1034.
- Dion, V. und Gasser, S. M.** (2013). Chromatin movement in the maintenance of genome stability. *Cell.* 152(6), 1355–1364.
- Dobbels, A. A.; Michno, J.-M.; Campbell, B. W.; Viridi, K. S.; Stec, A. O.; Muehlbauer, G. J.; Naeve, S. L. und Stupar, R. M.** (2017). An Induced Chromosomal Translocation in Soybean Disrupts a KASI Ortholog and Is Associated with a High-Sucrose and Low-Oil Seed Phenotype. *G3 (Bethesda).* 7(4), 1215–1223.
- Dobbs, T. A.; Tainer, J. A. und Lees-Miller, S. P.** (2010). A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation. *DNA Repair (Amst).* 9(12), 1307–1314.

-
- Doench, J. G.; Fusi, N.; Sullender, M.; Hegde, M.; Vaimberg, E. W.; Donovan, K. F.; Smith, I.; Tothova, Z.; Wilen, C.; Orchard, R.; Virgin, H. W.; Listgarten, J. und Root, D. E.** (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 34(2), 184–191.
- Dorn, A.; Röhrig, S.; Papp, K.; Schröpfer, S.; Hartung, F.; Knoll, A. und Puchta, H.** (2018). The topoisomerase 3 α zinc-finger domain T1 of *Arabidopsis thaliana* is required for targeting the enzyme activity to Holliday junction-like DNA repair intermediates. *PLoS Genet.* 14(9), e1007674.
- Drouaud, J.; Camilleri, C.; Bourguignon, P.-Y.; Canaguier, A.; Bérard, A.; Vezon, D.; Giancola, S.; Brunel, D.; Colot, V.; Prum, B.; Quesneville, H. und Mézard, C.** (2006). Variation in crossing-over rates across chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* reveals the presence of meiotic recombination "hot spots". *Genome Res.* 16(1), 106–114.
- Dubest, S.; Gallego, M. E. und White, C. I.** (2002). Role of the AtRad1p endonuclease in homologous recombination in plants. *EMBO Rep.* 3(11), 1049–1054.
- Durr, J.; Papareddy, R.; Nakajima, K. und Gutierrez-Marcos, J.** (2018). Highly efficient heritable targeted deletions of gene clusters and non-coding regulatory regions in *Arabidopsis* using CRISPR/Cas9. *Sci Rep.* 8(1), 4443.
- Egli, D.; Hafen, E. und Schaffner, W.** (2004). An efficient method to generate chromosomal rearrangements by targeted DNA double-strand breaks in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 14(7), 1382–1393.
- Eid, A.; Ali, Z. und Mahfouz, M. M.** (2016). High efficiency of targeted mutagenesis in *Arabidopsis* via meiotic promoter-driven expression of Cas9 endonuclease. *Plant Cell Rep.* 35(7), 1555–1558.
- Elliott, B.; Richardson, C. und Jasin, M.** (2005). Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. *Mol. Cell.* 17(6), 885–894.
- Endo, M.; Mikami, M. und Toki, S.** (2016). Biallelic Gene Targeting in Rice. *Plant Physiol.* 170(2), 667–677.
- Eschbach, V. und Kobbe, D.** (2014). Different replication protein A complexes of *Arabidopsis thaliana* have different DNA-binding properties as a function of heterotrimer composition. *Plant Cell Physiol.* 55(8), 1460–1472.
- Essen, L. O. und Klar, T.** (2006). Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(11), 1266–1277.

-
- Esvelt, K. M.; Mali, P.; Braff, J. L.; Moosburner, M.; Yaung, S. J. und Church, G. M.** (2013). Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods*. 10(11), 1116–1121.
- Fang, Z.; Pyhäjärvi, T.; Weber, A. L.; Dawe, R. K.; Glaubitz, J. C.; González, J. d. J. S.; Ross-Ibarra, C.; Doebley, J.; Morrell, P. L. und Ross-Ibarra, J.** (2012). Megabase-scale inversion polymorphism in the wild ancestor of maize. *Genetics*. 191(3), 883–894.
- Faridounnia, M.; Folkers, G. E. und Boelens, R.** (2018). Function and Interactions of ERCC1-XPF in DNA Damage Response. *Molecules*. 23(12)).
- Fausser, 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.
- Fell, V. L. und Schild-Poulter, C.** (2015). The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 763, 15–29.
- Feng, Z.; Zhang, B.; Ding, W.; Liu, X.; Yang, D.-L.; Wei, P.; Cao, F.; Zhu, S.; Zhang, F.; Mao, Y. und Zhu, J.-K.** (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*. 23(10), 1229–1232.
- Fishman, L. und Sweigart, A. L.** (2018). When Two Rights Make a Wrong: The Evolutionary Genetics of Plant Hybrid Incompatibilities. *Annu Rev Plant Biol*. 69, 707–731.
- Frank-Vaillant, M. und Marcand, S.** (2002). Transient Stability of DNA Ends Allows Nonhomologous End Joining to Precede Homologous Recombination. *Mol. Cell*. 10(5), 1189–1199.
- Gabur, I.; Chawla, H. S.; Snowdon, R. J. und Parkin, I. A. P.** (2019). Connecting genome structural variation with complex traits in crop plants. *Theor Appl Genet*. 132(3), 733–750.
- Gallego, F.; Fleck, O.; Li, A.; Wyrzykowska, J. und Tinland, B.** (2000). AtRAD1, a plant homologue of human and yeast nucleotide excision repair endonucleases, is involved in dark repair of UV damages and recombination. *Plant J*. 21(6), 507–518.
- Gallego, M. E.; Jalut, N. und White, C. I.** (2003). Telomerase dependence of telomere lengthening in Ku80 mutant *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 15(3), 782–789.
- Gao, J.; Wang, G.; Ma, S.; Xie, X.; Wu, X.; Zhang, X.; Wu, Y.; Zhao, P. und Xia, Q.** (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol*. 87(1-2), 99–110.
- Geisinger, J. M.; Turan, S.; Hernandez, S.; Spector, L. P. und Calos, M. P.** (2016). In vivo blunt-end cloning through CRISPR/Cas9-facilitated non-homologous end-joining. *Nucleic Acids Res*. 44(8), e76.

-
- Ghezraoui, H.; Piganeau, M.; Renouf, B.; Renaud, J.-B.; Sallmyr, A.; Ruis, B.; Oh, S.; Tomkinson, A. E.; Hendrickson, E. A.; Giovannangeli, C.; Jasin, M. und Brunet, E.** (2014). Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol Cell*. 55(6), 829–842.
- Gil-Humanes, J.; Wang, Y.; Liang, Z.; Shan, Q.; Ozuna, C. V.; Sánchez-León, S.; Baltes, N. J.; Starker, C.; Barro, F.; Gao, C. und Voytas, D. F.** (2017). High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J*. 89(6), 1251–1262.
- Gothe, H. J.; Minneker, V. und Roukos, V.** (2018). Dynamics of Double-Strand Breaks: Implications for the Formation of Chromosome Translocations. *Adv Exp Med Biol*. 1044, 27–38.
- Grabarz, A.; Barascu, A.; Guirouilh-Barbat, J. und Lopez, B. S.** (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res*. 2(3), 249–268.
- Graham, T. G. W.; Carney, S. M.; Walter, J. C. und Loparo, J. J.** (2018). A single XLF dimer bridges DNA ends during nonhomologous end joining. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 25(9), 877–884.
- Graham, T. G. W.; Walter, J. C. und Loparo, J. J.** (2016). Two-Stage Synapsis of DNA Ends during Non-homologous End Joining. *Mol. Cell*. 61(6), 850–858.
- Gratz, S. J.; Cummings, A. M.; Nguyen, J. N.; Hamm, D. C.; Donohue, L. K.; Harrison, M. M.; Wildonger, J. und O'Connor-Giles, K. M.** (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*. 194(4), 1029–1035.
- Gravel, S.; Larrivé, M.; Labrecque, P. und Wellinger, R. J.** (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science*. 280(5364), 741–744.
- Gray, Y. H.M.** (2000). It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends in Genetics*. 16(10), 461–468.
- Gu, W.; Zhang, F. und Lupski, J. R.** (2008). Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 1(1), 4.
- Guo, T.; Feng, Y.-L.; Xiao, J.-J.; Liu, Q.; Sun, X.-N.; Xiang, J.-F.; Kong, N.; Liu, S.-C.; Chen, G.-Q.; Wang, Y.; Dong, M.-M.; Cai, Z.; Lin, H.; Cai, X.-J. und Xie, A.-Y.** (2018). Harnessing accurate non-homologous end joining for efficient precise deletion in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Genome Biol*. 19(1), 170.

-
- Hammel, M.; Rey, M.; Yu, Y.; Mani, R. S.; Classen, S.; Liu, M.; Pique, M. E.; Fang, S.; Mahaney, B. L.; Weinfeld, M.; Schriemer, D. C.; Lees-Miller, S. P. und Tainer, J. A.** (2011). XRCC4 protein interactions with XRCC4-like factor (XLF) create an extended grooved scaffold for DNA ligation and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 286(37), 32638–32650.
- Hammel, M.; Yu, Y.; Mahaney, B. L.; Cai, B.; Ye, R.; Phipps, B. M.; Rambo, R. P.; Hura, G. L.; Pelikan, M.; So, S.; Abolfath, R. M.; Chen, D. J.; Lees-Miller, S. P. und Tainer, J. A.** (2010). Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *J. Biol. Chem.* 285(2), 1414–1423.
- Han, Y.; Zhang, T.; Thammapichai, P.; Weng, Y. und Jiang, J.** (2015). Chromosome-Specific Painting in Cucumis Species Using Bulked Oligonucleotides. *Genetics.* 200(3), 771–779.
- Hartung, F. und Schiemann, J.** (2014). Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J.* 78(5), 742–752.
- Hartung, F.; Suer, S.; Knoll, A.; Wurz-Wildersinn, R. und Puchta, H.** (2008). Topoisomerase 3alpha and RMI1 suppress somatic crossovers and are essential for resolution of meiotic recombination intermediates in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 4(12), e1000285.
- Herrera-Estrella, L.; Block, M. D.; Messens, E.; Hernalsteens, J. P.; Montagu, M. V. und Schell, J.** (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2(6), 987–995.
- Hogg, M.; Sauer-Eriksson, A. E. und Johansson, E.** (2012). Promiscuous DNA synthesis by human DNA polymerase θ . *Nucleic Acids Res.* 40(6), 2611–2622.
- Hu, Y.; Chen, Z.; Zhuang, C. und Huang, J.** (2017). Cascade of chromosomal rearrangements caused by a heterogeneous T-DNA integration supports the double-stranded break repair model for T-DNA integration. *Plant J.* 90(5), 954–965.
- Hu, Z.; Cools, T. und Veylder, L. de** (2016). Mechanisms Used by Plants to Cope with DNA Damage. *Annu Rev Plant Biol.* 67, 439–462.
- Hua, K.; Zhang, J.; Botella, J. R.; Ma, C.; Kong, F.; Liu, B. und Zhu, J.-K.** (2019). Perspectives on the Application of Genome-Editing Technologies in Crop Breeding. *Mol Plant.* 12(8), 1047–1059.
- Huang, T.-K. und Puchta, H.** (2019). CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally a turn for the better for homologous recombination. *Plant Cell Rep.* 38(4), 443–453.
- Hurt, J. A.; Thibodeau, S. A.; Hirsh, A. S.; Pabo, C. O. und 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.

-
- Hyun, Y.; Kim, J.; Cho, S. W.; Choi, Y.; Kim, J.-S. und 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.
- Inagaki, S.; Nakamura, K. und Morikami, A. (2009). A link among DNA replication, recombination, and gene expression revealed by genetic and genomic analysis of TEBICHI gene of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*. 5(8), e1000613.
- Inagaki, S.; Suzuki, T.; Ohto, M.-a.; Urawa, H.; Horiuchi, T.; Nakamura, K. und Morikami, A. (2006). *Arabidopsis* TEBICHI, with helicase and DNA polymerase domains, is required for regulated cell division and differentiation in meristems. *Plant Cell*. 18(4), 879–892.
- Isalan, M.; Choo, Y. und 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. und Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 169(12), 5429–5433.
- Iyer, R. R.; Pluciennik, A.; Burdett, V. und Modrich, P. L. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem. Rev*. 106(2), 302–323.
- Jacquier, A. und Dujon, B. (1985). An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell*. 41(2), 383–394.
- Jia, Q.; Bundock, P.; Hooykaas, P. J. J. und Pater, S. de (2012). *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA Integration and Gene Targeting in *Arabidopsis thaliana* Non-Homologous End-Joining Mutants. *Journal of Botany*. 2012(2), 1–13.
- Jia, Q.; den Dulk-Ras, A.; Shen, H.; Hooykaas, P. J. J. und Pater, S. de (2013). Poly(ADP-ribose)polymerases are 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. und 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. und 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. und Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096), 816–821.

-
- Kadyk, L. C. und Hartwell, L. H.** (1992). Sister Chromatids Are Preferred over Homologs as Substrates for Recombinational Repair in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics*. 132(2), 387–402.
- Kakarougkas, A. und Jeggo, P. A.** (2014). DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol*. 87(1035), 20130685.
- Kapusi, E.; Corcuera-Gómez, M.; Melnik, S. und Stoger, E.** (2017). Heritable Genomic Fragment Deletions and Small Indels in the Putative ENGase Gene Induced by CRISPR/Cas9 in Barley. *Front Plant Sci*. 8, 540.
- Katz, S. S.; Gimble, F. S. und Storic, F.** (2014). To nick or not to nick. *PLoS ONE*. 9(2), e88840.
- Kavakli, I. H.; Ozturk, N. und Gul, S.** (2019). DNA repair by photolyases. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 115, 1–19.
- Kazda, A.; Zellinger, B.; Rössler, M.; Derboven, E.; Kusenda, B. und Riha, K.** (2012). Chromosome end protection by blunt-ended telomeres. *Genes Dev*. 26(15), 1703–1713.
- Kent, T.; Chandramouly, G.; McDevitt, S. M.; Ozdemir, A. Y. und Pomerantz, R. T.** (2015). Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ . *Nat. Struct. Mol. Biol*. 22(3), 230–237.
- Kent, T.; Mateos-Gomez, P. A.; Sfeir, A. und Pomerantz, R. T.** (2016). Polymerase θ is a robust terminal transferase that oscillates between three different mechanisms during end-joining. *Elife*. 5, e13740.
- Kim, E.; Kim, S.; Kim, D. H.; Choi, B.-S.; Choi, I.-Y. und Kim, J.-S.** (2012). Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. *Genome Res*. 22(7), 1327–1333.
- Kim, J.-H.; Ryu, T. H.; Lee, S. S.; Lee, S. und Chung, B. Y.** (2019). Ionizing radiation manifesting DNA damage response in plants: An overview of DNA damage signaling and repair mechanisms in plants. *Plant Sci*. 278, 44–53.
- Kim, Y. G.; Cha, J. und 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.
- Kirkpatrick, M. und Barton, N.** (2006). Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics*. 173(1), 419–434.
- Klein, T. M.; Fromm, M.; Weissinger, A.; Tomes, D.; Schaaf, S.; Sletten, M. und 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. und 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.

-
- Kleinboelting, N.; Huep, G. und Weisshaar, B.** (2017). Enhancing the GABI-Kat Arabidopsis thaliana T-DNA Insertion Mutant Database by Incorporating Araport11 Annotation. *Plant Cell Physiol.* 58(1), e7.
- Klemm, T.; Mannuß, A.; Kobbe, D.; Knoll, A.; Trapp, O.; Dorn, A. und Puchta, H.** (2017). The DNA translocase RAD5A acts independently of the other main DNA repair pathways, and requires both its ATPase and RING domain for activity in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 91(4), 725–740.
- Knoll, A.; Fauser, F. und Puchta, H.** (2014a). DNA recombination in somatic plant cells: mechanisms and evolutionary consequences. *Chromosome Res.* 22(2), 191–201.
- Knoll, A.; Higgins, J. D.; Seeliger, K.; Reha, S. J.; Dangel, N. J.; Bauknecht, M.; Schröpfer, S.; Franklin, F. C. H. und Puchta, H.** (2012). The Fanconi anemia ortholog FANCM ensures ordered homologous recombination in both somatic and meiotic cells in Arabidopsis. *Plant Cell.* 24(4), 1448–1464.
- Knoll, A.; Schröpfer, S. und Puchta, H.** (2014b). The RTR complex as caretaker of genome stability and its unique meiotic function in plants. *Front Plant Sci.* 5, 33.
- Koncz, C.; Kreuzaler, F.; Kalman, Z. und Schell, J.** (1984). A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. *EMBO J.* 3(5), 1029–1037.
- Koole, W.; van Schendel, R.; Karambelas, A. E.; van Heteren, J. T.; Okihara, K. L. und Tijsterman, M.** (2014). A Polymerase Theta-dependent repair pathway suppresses extensive genomic instability at endogenous G4 DNA sites. *Nat Commun.* 5, 3216.
- Koonin, E. V.; Makarova, K. S. und Zhang, F.** (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol.* 37, 67–78.
- Krawczyk, P. M.; Borovski, T.; Stap, J.; Cijssouw, T.; Cate, R. ten; Medema, J. P.; Kanaar, R.; Franken, N. A. P. und Aten, J. A.** (2012). Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Sci.* 125(9), 2127–2133.
- Krishnaswamy, L.; Zhang, J. und Peterson, T.** (2008). Reversed end Ds element: a novel tool for chromosome engineering in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 68(4-5), 399–411.
- Kruhlak, M. J.; Celeste, A.; Dellaire, G.; Fernandez-Capetillo, O.; Müller, W. G.; McNally, J. G.; Bazett-Jones, D. P. und Nussenzweig, A.** (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 172(6), 823–834.
- Kumlehn, J.; Pietralla, J.; Hensel, G.; Pacher, M. und Puchta, H.** (2018). The CRISPR/Cas revolution continues: From efficient gene editing for crop breeding to plant synthetic biology. *J Integr Plant Biol.* 60(12), 1127–1153.

-
- Lee, G. S.; Neiditch, M. B.; Salus, S. S. und Roth, D. B.** (2004). RAG proteins shepherd double-strand breaks to a specific pathway, suppressing error-prone repair, but RAG nicking initiates homologous recombination. *Cell*. 117(2), 171–184.
- Lee, H. J.; Kim, E. und Kim, J.-S.** (2010). Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res*. 20(1), 81–89.
- Lee, H. J.; Kweon, J.; Kim, E.; Kim, S. und Kim, J. S.** (2012). Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. *Genome Res*. 22(3), 539–548.
- Li, D.; Qiu, Z.; Shao, Y.; Chen, Y.; Guan, Y.; Liu, M.; Li, Y.; Gao, N.; Wang, L.; Lu, X.; Zhao, Y. und Liu, M.** (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31(8), 681–683.
- Li, J.; Meng, X.; Zong, Y.; Chen, K.; Zhang, H.; Liu, J.; Li, J. und Gao, C.** (2016a). Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat Plants*. 2, 16139.
- Li, J.-F.; Zhang, D. und Sheen, J.** (2015a). Targeted plant genome editing via the CRISPR/Cas9 technology. *Methods Mol Biol*. 1284, 239–255.
- Li, W.; Challa, G. S.; Zhu, H. und Wei, W.** (2016b). Recurrence of Chromosome Rearrangements and Reuse of DNA Breakpoints in the Evolution of the Triticeae Genomes. *G3 (Bethesda)*. 6(12), 3837–3847.
- Li, Y.; Park, A. I.; Mou, H.; Colpan, C.; Bizhanova, A.; Akama-Garren, E.; Joshi, N.; Hendrickson, E. A.; Feldser, D.; Yin, H.; Anderson, D. G.; Jacks, T.; Weng, Z. und Xue, W.** (2015b). A versatile reporter system for CRISPR-mediated chromosomal rearrangements. *Genome Biol*. 16, 111.
- Liang, G.; Zhang, H.; Lou, D. und Yu, D.** (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci Rep*. 6, 21451.
- Liang, L.; Deng, L.; Nguyen, S. C.; Zhao, X.; Maulion, C. D.; Shao, C. und Tischfield, J. A.** (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*. 36(10), 3297–3310.
- Lidder, P. und Sonnino, A.** (2012). Biotechnologies for the management of genetic resources for food and agriculture. *Adv Genet*. 78, 1–167.
- Lieber, M. R.** (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem*. 79, 181–211.
- Lin, F. L.; Sperle, K. und Sternberg, N.** (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell. Biol*. 4(6), 1020–1034.

-
- Lin, F. L.; Sperle, K. und Sternberg, N.** (1990). Repair of double-stranded DNA breaks by homologous DNA fragments during transfer of DNA into mouse L cells. *Mol. Cell. Biol.* 10(1), 113–119.
- Lisby, M.; Mortensen, U. H. und Rothstein, R.** (2003). Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol.* 5(6), 572–577.
- Livingstone, K. und Rieseberg, L.** (2004). Chromosomal evolution and speciation: a recombination-based approach. *New Phytol.* 161(1), 107–112.
- Lowry, D. B. und Willis, J. H.** (2010). A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation. *PLoS Biol.* 8(9), e1000500.
- Lupski, J. R.** (1998). Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet.* 14(10), 417–422.
- Lupski, J. R. und Stankiewicz, P.** (2005). Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.* 1(6), e49.
- Lysak, M. A.; Berr, A.; Pecinka, A.; Schmidt, R.; McBreen, K. und Schubert, I.** (2006). Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(13), 5224–5229.
- Lysak, M. A.; Fransz, P. F.; Ali, H. B. und Schubert, I.** (2001). Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 28(6), 689–697.
- Ma, C. J.; Kwon, Y.; Sung, P. und Greene, E. C.** (2017). Human RAD52 interactions with replication protein A and the RAD51 presynaptic complex. *J. Biol. Chem.* 292(28), 11702–11713.
- 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. und 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.
- Maddalo, D.; Manchado, E.; Concepcion, C. P.; Bonetti, C.; Vidigal, J. A.; Han, Y.-C.; Ogradowski, P.; Crippa, A.; Rekhman, N.; Stanchina, E. de; Lowe, S. W. und Ventura, A.** (2014). In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature.* 516(7531), 423–427.

-
- 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.; Cathomen, T.; Voytas, D. F. und 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. und Joung, J. K.** (2009). Oligomerized pool engineering (OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nat Protoc.* 4(10), 1471–1501.
- Maggert, K. A. und Golic, K. G.** (2005). Highly efficient sex chromosome interchanges produced by I-CreI expression in *Drosophila*. *Genetics.* 171(3), 1103–1114.
- Maizels, N. und Davis, L.** (2018). Initiation of homologous recombination at DNA nicks. *Nucleic Acids Res.* 46(14), 6962–6973.
- Makarova, K. S.; Grishin, N. V.; Shabalina, S. A.; Wolf, Y. I. und Koonin, E. V.** (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct.* 1, 7.
- Makarova, K. S.; Wolf, Y. I. und Koonin, E. V.** (2018). Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *CRISPR J.* 1(5), 325–336.
- Malaby, A. W.; Martin, S. K.; Wood, R. D. und Doublé, S.** (2017). Expression and Structural Analyses of Human DNA Polymerase θ (POLQ). *Meth Enzymol.* 592, 103–121.
- Mali, P.; Yang, L.; Esvelt, K. M.; Aach, J.; Guell, M.; DiCarlo, J. E.; Norville, J. E. und Church, G. M.** (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 339(6121), 823–826.
- Mannuss, A.; Dukowic-Schulze, S.; Suer, S.; Hartung, F.; Pacher, M. und 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.
- Mari, P.-O.; Florea, B. I.; Persengiev, S. P.; Verkaik, N. S.; Brüggewirth, H. T.; Modesti, M.; Gigliamari, G.; Bezstarosti, K.; Demmers, J. A. A.; Luider, T. M.; Houtsmuller, A. B. und van Gent, D. C.** (2006). Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(49), 18597–18602.

-
- Martin, G.; Carreel, F.; Coriton, O.; Hervouet, C.; Cardi, C.; Derouault, P.; Roques, D.; Salmon, F.; Rouard, M.; Sardos, J.; Labadie, K.; Baurens, F.-C. und D'Hont, A.** (2017). Evolution of the Banana Genome (*Musa acuminata*) Is Impacted by Large Chromosomal Translocations. *Mol Biol Evol.* 34(9), 2140–2152.
- Martin, G. M.; Smith, A. C.; Ketterer, D. J.; Ogburn, C. E. und Disteche, C. M.** (1985). Increased chromosomal aberrations in first metaphases of cells isolated from the kidneys of aged mice. *Isr J Med Sci.* 21(3), 296–301.
- Masani, S.; Han, L.; Meek, K. und Yu, K.** (2016). Redundant function of DNA ligase 1 and 3 in alternative end-joining during immunoglobulin class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113(5), 1261–1266.
- Mateos-Gomez, P. A.; Gong, F.; Nair, N.; Miller, K. M.; Lazzerini-Denchi, E. und Sfeir, A.** (2015). Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature.* 518(7538), 254–257.
- McClintock, B.** (1953). Induction of Instability at Selected Loci in Maize. *Genetics.* 38(6), 579–599.
- McClintock, B.** (1978). Mechanisms that rapidly reorganize the genome. *Stadler Genetics Symposium*(10), 25–47.
- McConnell Smith, A.; Takeuchi, R.; Pellenz, S.; Davis, L.; Maizels, N.; Monnat, R. J. und Stoddard, B. L.** (2009). Generation of a nicking enzyme that stimulates site-specific gene conversion from the I-AniI LAGLIDADG homing endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(13), 5099–5104.
- McIlwraith, M. J. und West, S. C.** (2008). DNA repair synthesis facilitates RAD52-mediated second-end capture during DSB repair. *Mol. Cell.* 29(4), 510–516.
- Meaburn, K. J.; Misteli, T. und Soutoglou, E.** (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol.* 17(1), 80–90.
- Medberry, S. L.; Dale, E.; Qin, M. und Ow, D. W.** (1995). Intra-chromosomal rearrangements generated by Cre-lox site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 23(3), 485–490.
- Metzger, M. J.; McConnell-Smith, A.; Stoddard, B. L. und Miller, A. D.** (2011). Single-strand nicks induce homologous recombination with less toxicity than double-strand breaks using an AAV vector template. *Nucleic Acids Res.* 39(3), 926–935.
- Metzger, M. J.; Stoddard, B. L. und Monnat, R. J.** (2013). PARP-mediated repair, homologous recombination, and back-up non-homologous end joining-like repair of single-strand nicks. *DNA Repair (Amst)*. 12(7), 529–534.
- Miné-Hattab, J. und Rothstein, R.** (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nat Cell Biol.* 14(5), 510–517.

-
- Molinier, J.** (2017). Genome and Epigenome Surveillance Processes Underlying UV Exposure in Plants. *Genes (Basel)*. 8(11).
- Molinier, J.; Stamm, M.-E. und Hohn, B.** (2004). SNM-dependent recombinational repair of oxidatively induced DNA damage in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep.* 5(10), 994–999.
- Moon, A. F.; Pryor, J. M.; Ramsden, D. A.; Kunkel, T. A.; Bebenek, K. und Pedersen, L. C.** (2014). Sustained active site rigidity during synthesis by human DNA polymerase μ . *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21(3), 253–260.
- Morineau, C.; Bellec, Y.; Tellier, F.; Gissot, L.; Kelemen, Z.; Nogu e, F. und Faure, J.-D.** (2017). Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnol J.* 15(6), 729–739.
- Nakajima, K.; Zhou, Y.; Tomita, A.; Hirade, Y.; Gurumurthy, C. B. und Nakada, S.** (2018). Precise and efficient nucleotide substitution near genomic nick via noncanonical homology-directed repair. *Genome Res.* 28(2), 223–230.
- Nassif, N.; Penney, J.; Pal, S.; Engels, W. R. und Gloor, G. B.** (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol. Cell. Biol.* 14(3), 1613–1625.
- Nekrasov, V.; Staskawicz, B.; Weigel, D.; Jones, J. D. G. und Kamoun, S.** (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31(8), 691–693.
- Nelms, B. E.; Maser, R. S.; MacKay, J. F.; Lagally, M. G. und Petrini, J. H.** (1998). In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science*. 280(5363), 590–592.
- Nick McElhinny, S. A.; Snowden, C. M.; McCarville, J. und Ramsden, D. A.** (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol. Cell. Biol.* 20(9), 2996–3003.
- Nimonkar, A. V.; Sica, R. A. und Kowalczykowski, S. C.** (2009). Rad52 promotes second-end DNA capture in double-stranded break repair to form complement-stabilized joint molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(9), 3077–3082.
- Nogu e, F.; Mara, K.; Collonnier, C. und Casacuberta, J. M.** (2016). Genome engineering and plant breeding: impact on trait discovery and development. *Plant Cell Rep.* 35(7), 1475–1486.
- Ochi, T.; Blackford, A. N.; Coates, J.; Jhujh, S.; Mehmood, S.; Tamura, N.; Travers, J.; Wu, Q.; Draviam, V. M.; Robinson, C. V.; Blundell, T. L. und Jackson, S. P.** (2015). DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science*. 347(6218), 185–188.

-
- Ordon, J.; Gantner, J.; Kemna, J.; Schwalgun, L.; Reschke, M.; Streubel, J.; Boch, J. und Stuttmann, J.** (2017). Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. *Plant J.* 89(1), 155–168.
- Orel, N.; Kyryk, A. und Puchta, H.** (2003). Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J.* 35(5), 604–612.
- Osakabe, K.; Abe, K.; Yoshioka, T.; Osakabe, Y.; Todoriki, S.; Ichikawa, H.; Hohn, B. und Toki, S.** (2006). Isolation and characterization of the RAD54 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 48(6), 827–842.
- Osborne, B. I.; Wirtz, U. und Baker, B.** (1995). A system for insertional mutagenesis and chromosomal rearrangement using the Ds transposon and Cre-lox. *Plant J.* 7(4), 687–701.
- Ota, S.; Hisano, Y.; Ikawa, Y. und Kawahara, A.** (2014). Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes Cells.* 19(7), 555–564.
- Pacher, M.; Schmidt-Puchta, W. und 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. und Nickoloff, J. A.** (2003). Gene conversion tracts in *Saccharomyces cerevisiae* can be extremely short and highly directional. *Nucleic Acids Res.* 31(4), 1164–1173.
- Pannunzio, N. R.; Watanabe, G. und Lieber, M. R.** (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 293(27), 10512–10523.
- Park, C.-Y.; Sung, J. J. und Kim, D.-W.** (2016). Genome Editing of Structural Variations: Modeling and Gene Correction. *Trends Biotechnol.* 34(7), 548–561.
- Park, J.; Lim, K.; Kim, J.-S. und Bae, S.** (2017). Cas-analyzer: an online tool for assessing genome editing results using NGS data. *Bioinformatics.* 33(2), 286–288.
- Penrose, L. S.; Ellis, J. R. und Delhanty, J. D.** (1960). Chromosomal translocations in mongolism and in normal relatives. *Lancet.* 2(7147), 409–410.
- Perrin, A.; Buckle, M. und Dujon, B.** (1993). Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions. *EMBO J.* 12(7), 2939–2947.
- Peterson, B. A.; Haak, D. C.; Nishimura, M. T.; Teixeira, P. J. P. L.; James, S. R.; Dangl, J. L. und Nimchuk, Z. L.** (2016). Genome-Wide Assessment of Efficiency and Specificity in CRISPR/Cas9 Mediated Multiple Site Targeting in *Arabidopsis*. *PLoS ONE.* 11(9), e0162169.

-
- Petolino, J. F.; Worden, A.; Curlee, K.; Connell, J.; Strange Moynahan, T. L.; Larsen, C. und Russell, S.** (2010). Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion. *Plant Mol. Biol.* 73(6), 617–628.
- Piazza, A.; Wright, W. D. und Heyer, W.-D.** (2017). Multi-invasions Are Recombination Byproducts that Induce Chromosomal Rearrangements. *Cell.* 170(4), 760-773.
- Pierce, A. J.; Hu, P.; Han, M.; Ellis, N. und Jasin, M.** (2001). Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* 15(24), 3237–3242.
- Piganeau, M.; Ghezraoui, H.; Cian, A. de; Guittat, L.; Tomishima, M.; Perrouault, L.; René, O.; Katibah, G. E.; Zhang, L.; Holmes, M. C.; Doyon, Y.; Concordet, J.-P.; Giovannangeli, C.; Jasin, M. und Brunet, E.** (2013). Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Res.* 23(7), 1182–1193.
- Pliss, A.; Malyavantham, K.; Bhattacharya, S.; Zeitz, M. und Berezney, R.** (2009). Chromatin dynamics is correlated with replication timing. *Chromosoma.* 118(4), 459–470.
- Porter, S. E.; Greenwell, P. W.; Ritchie, K. B. und Petes, T. D.** (1996). The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 24(4), 582–585.
- Prado, F. und 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.** (1998). Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. *Plant J.* 13(3), 331–339.
- 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.** (2017). Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Curr Opin Plant Biol.* 36, 1–8.
- Puchta, H.; Dujon, B. und Hohn, B.** (1996). Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(10), 5055–5060.
- Puchta, H. und Fauser, F.** (2013). Gene targeting in plants: 25 years later. *Int. J. Dev. Biol.* 57(6-8), 629–637.
- Qi, Y.; Li, X.; Zhang, Y.; Starker, C. G.; Baltes, N. J.; Zhang, F.; Sander, J. D.; Reyon, D.; Joung, J. K. und Voytas, D. F.** (2013a). Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *G3 (Bethesda).* 3(10), 1707–1715.

- Qi, Y.; Zhang, Y.; Zhang, F.; Baller, J. A.; Cleland, S. C.; Ryu, Y.; Starker, C. G. und Voytas, D. F.** (2013b). Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in Arabidopsis by manipulating DNA repair pathways. *Genome Res.* 23(3), 547–554.
- Qin, M.; Bayley, C.; Stockton, T. und Ow, D. W.** (1994). Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(5), 1706–1710.
- Ramsden, D. A. und Gellert, M.** (1998). Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *EMBO J.* 17(2), 609–614.
- Ranjha, L.; Howard, S. M. und Cejka, P.** (2018). Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma.* 127(2), 187–214.
- Renouf, B.; Piganeau, M.; Ghezraoui, H.; Jasin, M. und Brunet, E.** (2014). Creating cancer translocations in human cells using Cas9 DSBs and nCas9 paired nicks. *Meth Enzymol.* 546, 251–271.
- Reynolds, P.; Anderson, J. A.; Harper, J. V.; Hill, M. A.; Botchway, S. W.; Parker, A. W. und O'Neill, P.** (2012). The dynamics of Ku70/80 and DNA-PKcs at DSBs induced by ionizing radiation is dependent on the complexity of damage. *Nucleic Acids Res.* 40(21), 10821–10831.
- Richardson, C. und Jasin, M.** (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature.* 405(6787), 697–700.
- Rieseberg, L. H. und Willis, J. H.** (2007). Plant speciation. *Science.* 317(5840), 910–914.
- Riggi, N.; Cironi, L. und Stamenkovic, I.** (2018). Synovial sarcoma: when epigenetic changes dictate tumour development. *Swiss Med Wkly.* 148, w14667.
- Riha, K.; Watson, J. M.; Parkey, J. und Shippen, D. E.** (2002). Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in Arabidopsis mutants deficient in Ku70. *EMBO J.* 21(11), 2819–2826.
- Robert, I.; Dantzer, F. und Reina-San-Martin, B.** (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med.* 206(5), 1047–1056.
- Roberts, S. A.; Strande, N.; Burkhalter, M. D.; Strom, C.; Havener, J. M.; Hasty, P. und Ramsden, D. A.** (2010). Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature.* 464(7292), 1214–1217.
- Rodríguez-Leal, D.; Lemmon, Z. H.; Man, J.; Bartlett, M. E. und Lippman, Z. B.** (2017). Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell.* 171(2), 470–480.

-
- Röhrig, S.; Dorn, A.; Enderle, J.; Schindele, A.; Herrmann, N. J.; Knoll, A. und Puchta, H.** (2018). The RecQ-like helicase HRQ1 is involved in DNA crosslink repair in Arabidopsis in a common pathway with the Fanconi anemia-associated nuclease FAN1 and the postreplicative repair ATPase RAD5A. *New Phytol.* 218(4), 1478–1490.
- Roldán-Arjona, T.; Ariza, R. R. und Córdoba-Cañero, D.** (2019). DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters. *Front Plant Sci.* 10, 1055.
- Rosso, M. G.; Li, Y.; Strizhov, N.; Reiss, B.; Dekker, K. und Weisshaar, B.** (2003). An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* 53(1-2), 247–259.
- Roth, N.; Klimesch, J.; Dukowic-Schulze, S.; Pacher, M.; Mannuss, A. und 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.
- Rouen, A.; Pyram, K.; Pollet-Villard, X.; Hyon, C.; Dorna, M.; Marques, S.; Chantot-Bastaraud, S.; Joyé, N.; Cassuto, N. G. und Siffroi, J.-P.** (2013). Simultaneous cell by cell study of both DNA fragmentation and chromosomal segregation in spermatozoa from chromosomal rearrangement carriers. *J Assist Reprod Genet.* 30(3), 383–390.
- Roukos, V.; Voss, T. C.; Schmidt, C. K.; Lee, S.; Wangsa, D. und Misteli, T.** (2013). Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science.* 341(6146), 660–664.
- Rowley, J. D.** (2001). Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nat. Rev. Cancer.* 1(3), 245–250.
- Sakamoto, A. N.** (2019). Translesion Synthesis in Plants: Ultraviolet Resistance and Beyond. *Front Plant Sci.* 10, 1208.
- Saleh-Gohari, N.; Bryant, H. E.; Schultz, N.; Parker, K. M.; Cassel, T. N. und Helleday, T.** (2005). Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* 25(16), 7158–7169.
- Salomon, S. und Puchta, H.** (1998). Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J.* 17(20), 6086–6095.
- Samach, A.; Melamed-Bessudo, C.; Avivi-Ragolski, N.; Pietrokovski, S. und Levy, A. A.** (2011). Identification of plant RAD52 homologs and characterization of the Arabidopsis thaliana RAD52-like genes. *Plant Cell.* 23(12), 4266–4279.
- Sambrook, J. und Russell, D. W.,** 2001. *Molecular cloning - A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sancar, A.** (1994). Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry.* 33(1), 2–9.

-
- Sander, J. D.; Dahlborg, E. J.; Goodwin, M. J.; Cade, L.; Zhang, F.; Cifuentes, D.; Curtin, S. J.; Blackburn, J. S.; Thibodeau-Beganny, S.; Qi, Y.; Pierick, C. J.; Hoffman, E.; Maeder, M. L.; Khayter, C.; Reyon, D.; Dobbs, D.; Langenau, D. M.; Stupar, R. M.; Giraldez, A. J.; Voytas, D. F.; Peterson, R. T.; Yeh, J.-R. J. und Joung, J. K. (2011). Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods*. 8(1), 67–69.
- Sax, K. (1941). The Behavior of X-Ray Induced Chromosomal Aberrations in *Allium* Root Tip Cells. *Genetics*. 26(4), 418–425.
- Schimmel, J.; Kool, H.; van Schendel, R. und Tijsterman, M. (2017). Mutational signatures of non-homologous and polymerase theta-mediated end-joining in embryonic stem cells. *EMBO J*. 36(24), 3634–3649.
- Schindele, A.; Dorn, A. und Puchta, H. (2020). CRISPR/Cas brings plant biology and breeding into the fast lane. *Current Opinion in Biotechnology*. 61, 7–14.
- Schindele, P.; Wolter, F. und Puchta, H. (2018). Transforming plant biology and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13. *FEBS Lett*. 592(12), 1954–1967.
- Schmidt, C.; Pacher, M. und Puchta, H. (2019a). Efficient induction of heritable inversions in plant genomes using the CRISPR/Cas system. *Plant J*. 98(4), 577–589.
- Schmidt, C.; Schindele, P. und Puchta, H. (2019b). From gene editing to genome engineering: restructuring plant chromosomes via CRISPR/Cas. *aBIOTECH*. 36, 17.
- Schrank, B. R.; Aparicio, T.; Li, Y.; Chang, W.; Chait, B. T.; Gundersen, G. G.; Gottesman, M. E. und Gautier, J. (2018). Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature*. 559(7712), 61–66.
- Schröpfer, S.; Kobbe, D.; Hartung, F.; Knoll, A. und Puchta, H. (2014). Defining the roles of the N-terminal region and the helicase activity of RECQ4A in DNA repair and homologous recombination in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*. 42(3), 1684–1697.
- Schubert, I. (2018). What is behind "centromere repositioning"? *Chromosoma*. 127(2), 229–234.
- Schubert, I. und Vu, G. T. H. (2016). Genome Stability and Evolution: Attempting a Holistic View. *Trends Plant Sci*. 21(9), 749–757.
- Schutter, K. de; Joubès, J.; Cools, T.; Verkest, A.; Corellou, F.; Babiychuk, E.; van der Schueren, E.; Beeckman, T.; Kushnir, S.; Inzé, D. und Veylder, L. de (2007). *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell*. 19(1), 211–225.

-
- Seah, S.; Yaghoobi, J.; Rossi, M.; Gleason, C. A. und Williamson, V. M.** (2004). The nematode-resistance gene, Mi-1, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. *Theor Appl Genet.* 108(8), 1635–1642.
- Segal, D. J.; Stege, J. T. und Barbas, C. F.** (2003). Zinc fingers and a green thumb: manipulating gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 6(2), 163–168.
- Séguéla-Arnaud, M.; Crismani, W.; Larchevêque, C.; Mazel, J.; Froger, N.; Choinard, S.; Lemhemdi, A.; Macaisne, N.; van Leene, J.; Gevaert, K.; Jaeger, G. de; Chelysheva, L. und Mercier, R.** (2015). Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3 α and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(15), 4713–4718.
- Seki, M.; Marini, F. und Wood, R. D.** (2003). POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. *Nucleic Acids Res.* 31(21), 6117–6126.
- Seol, J.-H.; Shim, E. Y. und Lee, S. E.** (2018). Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutat. Res.* 809, 81–87.
- Serebrovski, A. S.** (1929). A General Scheme for the Origin of Mutations. *The American Naturalist.* 63(687), 374–378.
- Serra, H.; Da Ines, O.; Degroote, F.; Gallego, M. E. und White, C. I.** (2013). Roles of XRCC2, RAD51B and RAD51D in RAD51-independent SSA recombination. *PLoS Genet.* 9(11), e1003971.
- Shan, Q.; Wang, Y.; Chen, K.; Liang, Z.; Li, J.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Liu, J.; Voytas, D. F.; Zheng, X.; Zhang, Y. und Gao, C.** (2013a). Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol Plant.* 6(4), 1365–1368.
- Shan, Q.; Wang, Y.; Li, J.; Zhang, Y.; Chen, K.; Liang, Z.; Zhang, K.; Liu, J.; Xi, J. J.; Qiu, J.-L. und Gao, C.** (2013b). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31(8), 686–688.
- Shen, H.; Strunks, G. D.; Klemann, B. J. P. M.; Hooykaas, P. J. J. und Pater, S. de** (2017a). CRISPR/Cas9-Induced Double-Strand Break Repair in Arabidopsis Nonhomologous End-Joining Mutants. *G3 (Bethesda).* 7(1), 193–202.
- Shen, L.; Hua, Y.; Fu, Y.; Li, J.; Liu, Q.; Jiao, X.; Xin, G.; Wang, J.; Wang, X.; Yan, C. und Wang, K.** (2017b). Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Sci China Life Sci.* 60(5), 506–515.
- Shi, J. und Lai, J.** (2015). Patterns of genomic changes with crop domestication and breeding. *Curr Opin Plant Biol.* 24, 47–53.

-
- Shmakov, S.; Smargon, A.; Scott, D.; Cox, D.; Pyzocha, N.; Yan, W.; Abudayyeh, O. O.; Gootenberg, J. S.; Makarova, K. S.; Wolf, Y. I.; Severinov, K.; Zhang, F. und Koonin, E. V.** (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 15(3), 169–182.
- Shou, J.; Li, J.; Liu, Y. und Wu, Q.** (2018). Precise and Predictable CRISPR Chromosomal Rearrangements Reveal Principles of Cas9-Mediated Nucleotide Insertion. *Mol Cell.* 71(4), 498–509.
- Siebert, R. und 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.
- Simon, L.; Rabanal, F. A.; Dubos, T.; Oliver, C.; Lauber, D.; Poulet, A.; Vogt, A.; Mandlbauer, A.; Le Goff, S.; Sommer, A.; Duborjal, H.; Tatout, C. und Probst, A. V.** (2018). Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 46(6), 3019–3033.
- Simsek, D.; Brunet, E.; Wong, S. Y.-W.; Katyal, S.; Gao, Y.; McKinnon, P. J.; Lou, J.; Zhang, L.; Li, J.; Rebar, E. J.; Gregory, P. D.; Holmes, M. C. und Jasin, M.** (2011). DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet.* 7(6), e1002080.
- Simsek, D. und Jasin, M.** (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17(4), 410–416.
- Singatulina, A. S.; Hamon, L.; Sukhanova, M. V.; Desforges, B.; Joshi, V.; Bouhss, A.; Lavrik, O. I. und Pastré, D.** (2019). PARP-1 Activation Directs FUS to DNA Damage Sites to Form PARG-Reversible Compartments Enriched in Damaged DNA. *Cell Rep.* 27(6), 1809-1821.e5.
- Singleton, B. K.; Torres-Arzayus, M. I.; Rottinghaus, S. T.; Taccioli, G. E. und Jeggo, P. A.** (1999). The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Mol. Cell. Biol.* 19(5), 3267–3277.
- Smith, J.; Bibikova, M.; Whitby, F. G.; Reddy, A. R.; Chandrasegaran, S. und 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.
- Smith, J.; Grizot, S.; Arnould, S.; Duclert, A.; Epinat, J.-C.; Chames, P.; Prieto, J.; Redondo, P.; Blanco, F. J.; Bravo, J.; Montoya, G.; Pâques, F. und Duchateau, P.** (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* 34(22), e149.

-
- Soni, A.; Siemann, M.; Grabos, M.; Murmann, T.; Pantelias, G. E. und Iliakis, G. (2014).** Requirement for Parp-1 and DNA ligases 1 or 3 but not of Xrcc1 in chromosomal translocation formation by backup end joining. *Nucleic Acids Res.* 42(10), 6380–6392.
- Soutoglou, E.; Dorn, J. F.; Sengupta, K.; Jasin, M.; Nussenzweig, A.; Ried, T.; Danuser, G. und Misteli, T. (2007).** Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 9(6), 675–682.
- Spampinato, C. P.; Gomez, R. L.; Galles, C. und Lario, L. D. (2009).** From bacteria to plants: a compendium of mismatch repair assays. *Mutat. Res.* 682(2-3), 110–128.
- 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.
- Steinert, J.; Schiml, S. und Puchta, H. (2016).** Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. *Plant Cell Rep.* 35(7), 1429–1438.
- Steinert, J.; Schmidt, C. und Puchta, H. (2017).** Use of the Cas9 Orthologs from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus* for Non-Homologous End-Joining Mediated Site-Specific Mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol Biol.* 1669, 365–376.
- Strande, N.; Roberts, S. A.; Oh, S.; Hendrickson, E. A. und Ramsden, D. A. (2012).** Specificity of the dRP/AP lyase of Ku promotes nonhomologous end joining (NHEJ) fidelity at damaged ends. *J. Biol. Chem.* 287(17), 13686–13693.
- Strathern, J. N.; Weinstock, K. G.; Higgins, D. R. und McGill, C. B. (1991).** A Novel Recombinator in Yeast Based on Gene II Protein from Bacteriophage F1. *Genetics.* 127(1), 61–73.
- Sun, X.; Hu, Z.; Chen, R.; Jiang, Q.; Song, G.; Zhang, H. und Xi, Y. (2015).** Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep.* 5, 10342.
- Sun, Y.; Li, J. und Xia, L. (2016).** Precise Genome Modification via Sequence-Specific Nucleases-Mediated Gene Targeting for Crop Improvement. *Front Plant Sci.* 7, 1928.
- Sunder, S. und Wilson, T. E. (2019).** Frequency of DNA end joining in trans is not determined by the predamage spatial proximity of double-strand breaks in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116(19), 9481–9490.
- Svitashev, S.; Young, J. K.; Schwartz, C.; Gao, H.; Falco, S. C. und Cigan, A. M. (2015).** Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant Physiol.* 169(2), 931–945.

-
- Szczepek, M.; Brondani, V.; Büchel, J.; Serrano, L.; Segal, D. J. und Cathomen, T.** (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 25(7), 786–793.
- Szostak, J. W.; Orr-Weaver, T. L.; Rothstein, R. J. und Stahl, F. W.** (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* 33(1), 25–35.
- Tamura, K.; Adachi, Y.; Chiba, K.; Oguchi, K. und Takahashi, H.** (2002). Identification of Ku70 and Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double-strand breaks. *Plant J.* 29(6), 771–781.
- Thompson, S. L. und Compton, D. A.** (2011). Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Res.* 19(3), 433–444.
- Thomson, I.; Gilchrist, S.; Bickmore, W. A. und Chubb, J. R.** (2004). The radial positioning of chromatin is not inherited through mitosis but is established de novo in early G1. *Curr Biol.* 14(2), 166–172.
- Tomimatsu, N.; Tahimic, C. G. T.; Otsuki, A.; Burma, S.; Fukuhara, A.; Sato, K.; Shiota, G.; Oshimura, M.; Chen, D. J. und Kurimasa, A.** (2007). Ku70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.* 282(14), 10138–10145.
- Torres, R.; Martin, M. C.; Garcia, A.; Cigudosa, J. C.; Ramirez, J. C. und Rodriguez-Perales, S.** (2014). Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun.* 5, 3964.
- Torres-Ruiz, R.; Martinez-Lage, M.; Martin, M. C.; Garcia, A.; Bueno, C.; Castaño, J.; Ramirez, J. C.; Menendez, P.; Cigudosa, J. C. und Rodriguez-Perales, S.** (2017). Efficient Recreation of t(11;22) EWSR1-FLI1+ in Human Stem Cells Using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports.* 8(5), 1408–1420.
- Truong, L. N.; Li, Y.; Shi, L. Z.; Hwang, P. Y.-H.; He, J.; Wang, H.; Razavian, N.; Berns, M. W. und Wu, X.** (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(19), 7720–7725.
- Tsutsui, H. und Higashiyama, T.** (2017). pKAMA-ITACHI Vectors for Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 58(1), 46–56.
- Tuteja, N.; Ahmad, P.; Panda, B. B. und Tuteja, R.** (2009). Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat. Res.* 681(2-3), 134–149.
- Upadhyay, S. K.; Kumar, J.; Alok, A. und Tuli, R.** (2013). RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda).* 3(12), 2233–2238.

- van Attikum, H. und Gasser, S. M.** (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.* 19(5), 207–217.
- van Dyck, E.; Stasiak, A. Z.; Stasiak, A. und West, S. C.** (2001). Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing. *EMBO Rep.* 2(10), 905–909.
- van Kregten, M.; Pater, S. de; Romeijn, R.; van Schendel, R.; Hooykaas, P. J. J. und Tijsterman, M.** (2016). T-DNA integration in plants results from polymerase- θ -mediated DNA repair. *Nat Plants.* 2(11), 16164.
- Voytas, D. F.** (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol.* 64, 327–350.
- Vriend, L. E. M.; Jasin, M. und Krawczyk, P. M.** (2014). Assaying break and nick-induced homologous recombination in mammalian cells using the DR-GFP reporter and Cas9 nucleases. *Meth Enzymol.* 546, 175–191.
- Vriend, L. E. M. und Krawczyk, P. M.** (2017). Nick-initiated homologous recombination: Protecting the genome, one strand at a time. *DNA Repair (Amst).* 50, 1–13.
- Vriend, L. E. M.; Prakash, R.; Chen, C.-C.; Vanoli, F.; Cavallo, F.; Zhang, Y.; Jasin, M. und Krawczyk, P. M.** (2016). Distinct genetic control of homologous recombination repair of Cas9-induced double-strand breaks, nicks and paired nicks. *Nucleic Acids Res.* 44(11), 5204–5217.
- Walbot, V.** (1985). On the life strategies of plants and animals. *Trends Genet.* 1, 165–169.
- Walbot, V. und Evans, M. M. S.** (2003). Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nat. Rev. Genet.* 4(5), 369–379.
- Walker, J. R.; Corpina, R. A. und Goldberg, J.** (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature.* 412(6847), 607–614.
- Wang, M.; Lu, Y.; Botella, J. R.; Mao, Y.; Hua, K. und Zhu, J.-K.** (2017). Gene Targeting by Homology-Directed Repair in Rice Using a Geminivirus-Based CRISPR/Cas9 System. *Mol Plant.* 10(7), 1007–1010.
- Wang, M.; Wu, W.; Wu, W.; Rosidi, B.; Zhang, L.; Wang, H. und Iliakis, G.** (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 34(21), 6170–6182.
- Wang, Y.; Ghosh, G. und Hendrickson, E. A.** (2009). Ku86 represses lethal telomere deletion events in human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(30), 12430–12435.

- Wang, Z.-P.; Xing, H.-L.; Dong, L.; Zhang, H.-Y.; Han, C.-Y.; Wang, X.-C. und 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.
- Waterworth, W. M.; Drury, G. E.; Bray, C. M. und West, C. E.** (2011). Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytol.* 192(4), 805–822.
- Weckselblatt, B. und Rudd, M. K.** (2015). Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements. *Trends Genet.* 31(10), 587–599.
- Weigel, D. und Glazebrook, J.**, 2002. *Arabidopsis - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Weinstock, D. M.; Brunet, E. und Jasin, M.** (2007). Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat Cell Biol.* 9(8), 978–981.
- West, C. E.; Waterworth, W. M.; Jiang, Q. und 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.
- West, C. E.; Waterworth, W. M.; Story, G. W.; Sunderland, P. A.; Jiang, Q. und Bray, C. M.** (2002). Disruption of the Arabidopsis AtKu80 gene demonstrates an essential role for AtKu80 protein in efficient repair of DNA double-strand breaks in vivo. *Plant J.* 31(4), 517–528.
- White, M. J. D.**, 1978. *Modes of speciation*. Freeman, San Francisco.
- Wilch, E. S. und Morton, C. C.** (2018). Historical and Clinical Perspectives on Chromosomal Translocations. *Adv Exp Med Biol.* 1044, 1–14.
- Williams, G. J.; Hammel, M.; Radhakrishnan, S. K.; Ramsden, D.; Lees-Miller, S. P. und Tainer, J. A.** (2014). Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair (Amst)*. 17, 110–120.
- Wolter, F.; Klemm, J. und Puchta, H.** (2018). Efficient in planta gene targeting in Arabidopsis using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of Staphylococcus aureus. *Plant J.* 94(4), 735–746.
- Wolter, F.; Schindele, P. und Puchta, H.** (2019). Plant breeding at the speed of light: the power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. *BMC Plant Biol.* 19(1), 176.
- Wood, R. D. und Doublé, S.** (2016). DNA polymerase θ (POLQ), double-strand break repair, and cancer. *DNA Repair (Amst)*. 44, 22–32.

-
- Wray, J.; Williamson, E. A.; Singh, S. B.; Wu, Y.; Cogle, C. R.; Weinstock, D. M.; Zhang, Y.; Lee, S.-H.; Zhou, D.; Shao, L.; Hauer-Jensen, M.; Pathak, R.; Klimek, V.; Nickoloff, J. A. und Hromas, R. (2013). PARP1 is required for chromosomal translocations. *Blood*. 121(21), 4359–4365.
- Wu, H.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Yang, M.; Lv, J.; Liu, J. und Zhang, Y. (2015). TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(13), E1530-9.
- Wu, R.; Lucke, M.; Jang, Y.-T.; Zhu, W.; Symeonidi, E.; Wang, C.; Fitz, J.; Xi, W.; Schwab, R. und Weigel, D. (2018). An efficient CRISPR vector toolbox for engineering large deletions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods*. 14, 65.
- Wyatt, D. W.; Feng, W.; Conlin, M. P.; Yousefzadeh, M. J.; Roberts, S. A.; Mieczkowski, P.; Wood, R. D.; Gupta, G. P. und Ramsden, D. A. (2016). Essential Roles for Polymerase θ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. *Mol Cell*. 63(4), 662–673.
- Wyatt, H. D. M. und West, S. C. (2014). Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 6(9), a023192.
- Xu, H.; Swoboda, I.; Bhalla, P. L.; Sijbers, A. M.; Zhao, C.; Ong, E. K.; Hoeijmakers, J. H. und Singh, M. B. (1998). Plant homologue of human excision repair gene ERCC1 points to conservation of DNA repair mechanisms. *Plant J*. 13(6), 823–829.
- Yan, L.; Wei, S.; Wu, Y.; Hu, R.; Li, H.; Yang, W. und Xie, Q. (2015). High-Efficiency Genome Editing in *Arabidopsis* Using YAO Promoter-Driven CRISPR/Cas9 System. *Mol Plant*. 8(12), 1820–1823.
- Yeh, C. D.; Richardson, C. D. und Corn, J. E. (2019). Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. *Nat Cell Biol*. 21(12), 1468–1478.
- Yoshiyama, K.; Conklin, P. A.; Huefner, N. D. und Britt, A. B. (2009). Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(31), 12843–12848.
- Yoshiyama, K. O.; Kobayashi, J.; Ogita, N.; Ueda, M.; Kimura, S.; Maki, H. und Umeda, M. (2013). ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Rep*. 14(9), 817–822.
- Yourik, P.; Fuchs, R. T.; Mabuchi, M.; Curcuru, J. L. und Robb, G. B. (2019). *Staphylococcus aureus* Cas9 is a multiple-turnover enzyme. *RNA*. 25(1), 35–44.
- Yu, A. M. und McVey, M. (2010). Synthesis-dependent microhomology-mediated end joining accounts for multiple types of repair junctions. *Nucleic Acids Res*. 38(17), 5706–5717.

-
- Yu, C.; Han, F.; Zhang, J.; Birchler, J. und Peterson, T.** (2012). A transgenic system for generation of transposon Ac/Ds-induced chromosome rearrangements in rice. *Theor Appl Genet.* 125(7), 1449–1462.
- Yu, X. und Gabriel, A.** (2004). Reciprocal translocations in *Saccharomyces cerevisiae* formed by nonhomologous end joining. *Genetics.* 166(2), 741–751.
- Zahn, K. E.; Averill, A. M.; Aller, P.; Wood, R. D. und Doubl  , S.** (2015). Human DNA polymerase θ grasps the primer terminus to mediate DNA repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22(4), 304–311.
- Zapata, L.; Ding, J.; Willing, E.-M.; Hartwig, B.; Bezdan, D.; Jiao, W.-B.; Patel, V.; Velikkakam James, G.; Koornneef, M.; Ossowski, S. und Schneeberger, K.** (2016). Chromosome-level assembly of *Arabidopsis thaliana* Ler reveals the extent of translocation and inversion polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113(28), E4052-60.
- Zhang, C.; Liu, C.; Weng, J.; Cheng, B.; Liu, F.; Li, X. und Xie, C.** (2017). Creation of targeted inversion mutations in plants using an RNA-guided endonuclease. *The Crop Journal.* 5(1), 83–88.
- Zhang, F.; Khajavi, M.; Connolly, A. M.; Towne, C. F.; Batish, S. D. und Lupski, J. R.** (2009). The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet.* 41(7), 849–853.
- Zhang, J. und Peterson, T.** (2004). Transposition of reversed Ac element ends generates chromosome rearrangements in maize. *Genetics.* 167(4), 1929–1937.
- Zhang, W.; Subbarao, S.; Addae, P.; Shen, A.; Armstrong, C.; Peschke, V. und Gilbertson, L.** (2003). Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theor Appl Genet.* 107(7), 1157–1168.
- Zhang, Y.; Massel, K.; Godwin, I. D. und Gao, C.** (2018). Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biol.* 19(1), 210.
- Zhou, H.; Liu, B.; Weeks, D. P.; Spalding, M. H. und Yang, B.** (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res.* 42(17), 10903–10914.

8 Anhang

8.1 Oligonukleotide, Primerkombinationen und PCR-Bedingungen

Tabelle 8-1: Primersequenzen. Aufgelistet sind alle in dieser Arbeit in verschiedenen PCR-Ansätzen verwendeten Primer mit ihrer Sequenz in 5'-3' Richtung.

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'
Primer für ddPCR und PCR-basierte Genotypisierung der Translokationen		
NBE-83	J1_Chrl/II-T fw	acgtgtaaactgggcctaagc
NBE-86_neu	J2_Chrl/II-T rv	tacagagataagtcgagggagag
NBE-90	J1_Chrl/II-T rv	cactgtcctttgatgtctatatcgc
NBE-135	NP1_Chrl/II-T rv	acggaaggtttgattaccactc
NBE-140	J2_Chrl/II-T rv	agccaaaacatgtttcgacg
NBE-273	NP1_Chrl/II-T fw	aggagcctggacgctaaagag
NBE-275	NP3_Chrl/II-T fw	agatagcattcggcattcagcc
NBE-276	NP3_Chrl/II-T rv	tgagagatgaccgtttgttgaaagc
NBE-297	J2_Chrl/II-T fw	accctcgttgttgaaaattgttagtcc
NBE-310	J2_Chrl/V-T fw	tctatatttcgactccgccactg
NBE-311	J2_Chrl/V-T rv	accaaagattgatgccggttctg
NBE-403	J1_Chrl/V-T fw2	tctgccatcggagcaaagtc
ALI-67	J1_Chrl/V-T rv	tcggtgcatccacatcatttac
Primers für das Next Generation Sequencing		
NBE-420	NGS_I-T(ALI)_Col-0 fw	CAATAGcgatttcagccggttagtggg
NBE-421	NGS_I-T(ALI)_Col-0 rv	CAATAGaccaaaagattgatgccggttctg
NBE-428	NGS_V-T_Col-0 fw	GCACATtctatatttcgactccgccactg
NBE-429	NGS_V-T_Col-0 rv	GCACATtcggtgcatccacatcatttac
NBE-448	NGS_I-T_Col-0 fw	TTGAGCacgtgtaaactgggcctaagc
NBE-449	NGS_I-T_Col-0 rv	TTGAGCtgtcgtaaactgggctagaaagag
NBE-458	NGS_II-T_Col-0 fw	TGTAATcctcgttgttgaaaattgttagtcc
NBE-459	NGS_II-T_Col-0 rv	TGTAATcactgtcctttgatgtctatatcgc
NBE-484	NGS_I/II-T_J1_fw	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG+ acgtgtaaactgggcctaagc
NBE-485	NGS_I/II-T_J1_rv	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG+ cactgtcctttgatgtctatatcgc
NBE-486	NGS_I/II-T_J2_fw1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG+ accctcgttgttgaaaattgttagtcc
NBE-487	NGS_I/II-T_J2_rv1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG+ tacagagataagtcgagggagag
Primer zum Nachweis der translozierten Bereiche		
NBE-505	Chrl_fw2	cattggcaaggcgcacttttg
NBE-506	Chrl_rv2	gcgggcatggtaattgttgag
NBE-507	Chrl_fw3	aactgagggaaaccggttgagc
NBE-508	Chrl_rv3	ttgaaccactctgacaccaagg
NBE-510	Chrl_rv4	tgttgttggtaacgccgagc

8. Anhang

NBE-511	ChrI_fw5	tccaagagacgaccatctgc
NBE-512	ChrI_rv5	cgagggtgcaatcagccaattc
NBE-513	ChrI_fw6	agaagaagtgcttgctgcgag
NBE-514	ChrI_rv6	aagaactcccatgactggacc
NBE-516	ChrII_rv1	acaatctcaagtgcctcctgg
NBE-517	ChrII_fw2	cttgatggttggtggcttgcc
NBE-519	ChrII_fw3	tgtgcctcgtcagagttcttc
NBE-520	ChrII_rv3	gttgattgaaacgctgatccctg
NBE-521	ChrII_fw4	gtctggttgctgctctgtg
NBE-522	ChrII_rv4	tctctgtttcctcatgttcctgc
NBE-525	ChrII_fw6	ttcttccgcctgcaaagagc
NBE-526	ChrII_rv6	tccactgtctagcaaaccac
NBE-527	ChrI_fw1.1	agacaatctgggcacaagagg
NBE-528	ChrI_rv1.1	agtgttccatcaggcgcttc
NBE-529	ChrV_fw1	ctcactgatcctcctgctgc
NBE-530	ChrV_rv1	cggtgaagccagagaacatgc
NBE-531	ChrV_fw2	tctcaccaccacaaactcc
NBE-532	ChrV_rv2	gcaaccagcagttcctcagc
NBE-533	ChrV_fw3	tgtgccaccgagaagagttg
NBE-534	ChrV_rv3	tcgacatcatcaccaccgac
NBE-535	ChrV_fw4	tgaccagcatctctgcctc
NBE-536	ChrV_rv4	tagccgtgacactoccttcc
NBE-537	ChrV_fw5	accgcctgtggtctattgtg
NBE-538	ChrV_rv5	ttgacgcaagaaaggtgaaacg
NBE-539	ChrV_fw6	ttgaggatcttgctcgggtg
NBE-540	ChrV_rv6	accatgccttgcttctctcc
NBE-541	ChrV_fw7	tgccgtcaatctccgctaag
NBE-542	ChrV_rv7	ttccctcacacaaccatcc
NBE-543	ChrV_fw8	tccacttctcctccacctcc
NBE-544	ChrV_rv8	gattgctgcggttgaccgag
NBE-545	ChrV_fw9	tccaatggtggtggtggaac
NBE-546	ChrV_rv9	accgggtaggcatcaagagc
NBE-547	ChrV_fw10	cgctgcttctctggcaaacg
NBE-548	ChrV_rv10	ggagagttcccttcggttcag
NBE-549	ChrV_fw11	ccacgccctaccttcttac
NBE-550	ChrV_rv11	aatgcttcagagcctcctgg
NBE-551	ChrV_fw12	tcccggtggtgatttctgg
NBE-552	ChrV_rv12	ccttctattctccgcctcc
NBE-553	ChrII_fw1-2	atgaacctgcctctgcatg
NBE-554	ChrII_rv2-2	agagcaggtacacttgtagc
NBE-557	ChrI_fw4-1	agttgtggtggagcaagtagc
NBE-560	ChrII_fw5-2	agcagaccttatccaccaatcg
NBE-561	ChrII_rv5-2	ttagcaccgcaagcctacaag

8. Anhang

Fortsetzung Tabelle 8-1: Primersequenzen.

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'
Primer für die Voramplifikation im T7-Endonuklease Assay		
NBE-107	SauCas9_Chrl-T_Nukleasekontrolle_FW	gcgaagatgcacgaagaagc
NBE-108	SauCas9_Chrl-T_Nukleasekontrolle_RV	aggtttgggcgaaggttaca
NBE-109	SauCas9_ChrlI-T_Nukleasekontrolle_FW	gacgagcttgcactatccca
NBE-110	SauCas9_ChrlI-T_Nukleasekontrolle_RV	tgacagtgtccacggtatta
Primer für die Gibson-Klonierung der Kontrollplasmide zur ddPCR Etablierung		
NBE-123	Gibson_Chrt-B1_fw1	GAAGTAGTGATTGctcctaagtttgatcctaataatgaac
NBE-124	Gibson_Chrt-B1_rev1	TTAATAACCAaaagggggttaaactacag
NBE-125	Gibson_Chrt-B1_fw2	AACCCCTTTtggttattaaggtgatggtttg
NBE-126	Gibson_Chrt-B1_rev2	CTAGCTCTAAAACcttcagactataacacaccatctc
NBE-127	Gibson_Chrt-B2_fw1	CAGCTAGAGTCGAAGTAGTGtgcctatgtgtaaacgaatacac
NBE-128	Gibson_Chrt-B2_rev1	GCTAATTTTCgtggagggttataaaccaaatc
NBE-129	Gibson_Chrt-B2_fw2	AACCCCTCCAcgaaattagctatTTTTgtatagttc
NBE-130	Gibson_Chrt-B2_rev2	ACTTGCTATTTCTAGCTCTAacttaaattttggttcgaggattaaag

Tabelle 8-2: Oligonukleotide der Spacer-Sequenzen zur Klonierung der T-DNA Konstrukte. Angegeben ist die Zielsequenz der Cas9-Proteine im *Arabidopsis*-Genom, die Benennung der Oligos sowie ihre Sequenz in 5'-3' Richtung. Das PAM in der Zielsequenz sowie die Überhänge für die Vektorintegration sind in Großbuchstaben dargestellt.

Zielsequenz im <i>Arabidopsis</i> -Genom	Nr.	Name	Sequenz 5'-3'
Spacer-Oligonukleotide zur TL-Induktion mit SaCas9			
Chr1 ACCCCctttcgaaattagctatTTTT	NBE-61	PS1-1_SaCas9_Chrl-T_fw	ATTGaaaaatagctaatttcgaaa
	NBE-62	PS1-1_SaCas9_Chrl-T_rev	AAACtttcgaaattagctatTTTT
Chr2 ACCCTCccatgggttattaaggtgtat	NBE-63	PS2_SaCas9_ChrlI-T_fw	ATTGatacaccttaataaccatgg
	NBE-64	PS2_SaCas9_ChrlI-T_rev	AAACccatgggttattaaggtgtat
Chr1 ACCCActagttaaccgcagtactaac	ALI-1	PS1-2_SaCas9_Chrl-T_fw	ATTGgtagtactgcggttaacta
	ALI-2	PS1-2_SaCas9_Chrl-T_rev	AAACtagttaaccgcagtactaac
Chr5 ACCCAatattttctaaccaaagcgta	ALI-3	PS5_SaCas9_ChrlV-T_fw	ATTGtacgctttggttagaaaata
	ALI-4	PS5_SaCas9_ChrlV-T_rev	AAACtattttctaaccaaagcgta
Spacer-Oligonukleotide zur HR-Induktion mit SpCas9-D10A			
DGU.US CCTgttatccctagcgccgc	SS-44	cr-DGU.US fw	ATTGgcgccgcctagggataaca
	SS-45	cr-DGU.US rev	AAACgttatccctagcgccgc
IU.GUS CCTgttatccctagtcgaccac	SS-46	cr-IU.GUS fw	ATTGgtgggtcgactagggataac
	SS-47	cr-IU.GUS rev	AAAGgttatccctagtcgaccac

Tabelle 8-3: LNA-Sonden für die droplet digital PCR. Angegeben sind die Benennung der in der ddPCR eingesetzten Sonden sowie ihre Sequenz in 5'-3' Richtung. Das Fluorophor sitzt am 5'-Ende (6FAM, HEX), am 3'-Ende ist der Quencher (BHQ1). LNA-Basen sind in eckige Klammern gesetzt und mit einem Pluszeichen gekennzeichnet.

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'
NBE-S1	Sonde_TL1-2_J1	[6FAM] -CCGGTATTAAG [+A] AAGCCACACA [+C] TAG- [BHQ1]
NBE-S2	Sonde_TL1-2_N1	[HEX] -AGCTTCTTCGTGCATC [+T] TCGCTC- [BHQ1]
NBE-S4	Sonde_TL1-2_J2	[6FAM] -TCGATGTCG [+G] CAA [+T] AAATTCGC- [BHQ1]
NBE-S5	Sonde_TL1-2_N3	[HEX] -TTGGGAGTAGTA [+T] AACCCGTTGC- [BHQ1]

Tabelle 8-4: Primerkombinationen and PCR-Bedingungen der droplet digital PCR. Aufgeführt sind die beiden Duplex-Ansätze für die Detektion der TL1-2 in der ddPCR, die dafür verwendeten Primerkombinationen, PCR-Bedingungen und eingesetzten Restriktionsenzyme (RE).

Translokation	Amplikon	Primerkombination	Sonde	Amplikonlänge	T _m	RE
TL1-2	J1	NBE-83 + NBE-90	+ NBE-S1 (FAM)	375 bp	58 °C	Sspl-HF
	N1	NBE-273 + NBE-135	+ NBE-S2 (HEX)	354 bp		
	J2	NBE-297 + NBE-86	+ NBE-S4 (FAM)	340 bp	58 °C	
	N3	NBE-275 + NBE-276	+ NBE-S5 (HEX)	241 bp		

Tabelle 8-5: Primerkombinationen and PCR-Bedingungen der PCR-basierten Genotypisierung bezüglich der Translokation. Aufgelistet sind die jeweiligen, im Rahmen einer PCR-basierten Genotypisierung verwendeten Primerkombinationen mit der entsprechenden Länge des Amplikons und den verwendeten Annealing-Temperaturen (T_m).

Translokation	Amplikon	Primerkombination	Amplikonlänge	T _m
TL1-2	Chr1	NBE-83 + NBE-140	463 bp	63 °C
	Chr2	NBE-87 + NBE-90	494 bp	
	J1	NBE-83 + NBE-90	375 bp	63 °C
	J2	NBE-87 + NBE-140	582 bp	
TL1-5	Chr1	NBE-403 + NBE-311	461 bp	58 °C
	Chr5	NBE310 + ALI-67	297 bp	
	J1	NBE-403 + ALI-67	435 bp	58 °C
	J2	NBE-310 + NBE-311	297 bp	

8. Anhang

Tabelle 8-6: Primerkombinationen und PCR-Bedingungen zur Detektion der translozierten Chromosomenabschnitte der für die TL homozygoten Pflanzen. Aufgelistet sind die verwendeten Primerkombinationen auf den translozierten Chromosomenabschnitten zur Detektion eines Fragmentes alle 100 kb, dessen Lokalisation mit der entsprechenden Länge des Amplikons und den verwendeten *Annealing*-Temperaturen (T_m).

Translokation	Amplikon	Lokalisation	Primerkombination	Amplikonlänge	T_m	
TL1-2	J1 - Chr2	1	19.220.339 - 19.222.787	NBE553 + NBE516	2448 bp	60 °C
		2	19.319.000 - 19.321.519	NBE517 + NBE554	2519 bp	
		3	19.421.413 - 19.423.974	NBE519 + NBE520	2561 bp	
		4	19.530.928 - 19.533.208	NBE521 + NBE522	2280 bp	
		5	19.629.645 - 19.632.083	NBE560 + NBE561	2438 bp	
		6	19.694.238 - 19.606.739	NBE525 + NBE526	2501 bp	
	J2 - Chr1	1	29.925.740 - 29.928.105	NBE527 + NBE528	2365 bp	60 °C
		2	30.020.769 - 30.023.262	NBE505 + NBE506	2493 bp	
		3	30.117.248 - 30.119.799	NBE507 + NBE508	2551 bp	
		4	30.215.391 - 30.217.960	NBE557 + NBE510	2569 bp	
		5	30.319.131 - 30.321.260	NBE511 + NBE512	2129 bp	
		6	30.424.639 - 30.427.143	NBE513 + NBE514	2504 bp	
TL1-5	J1 - Chr5	1	25.852.742 - 25.855.200	NBE529 + NBE530	2458 bp	60 °C
		2	25.952.760 - 25.955.007	NBE531 + NBE532	2247 bp	
		3	26.059.053 - 26.061.484	NBE533 + NBE534	2431 bp	
		4	26.162.933 - 26.165.256	NBE535 + NBE536	2323 bp	
		5	26.259.648 - 26.262.068	NBE537 + NBE538	2420 bp	
		6	26.359.821 - 26.362.496	NBE539 + NBE540	2675 bp	
	J2 - Chr1	7	26.461.428 - 26.463.703	NBE541 + NBE542	2275 bp	60 °C
		8	26.574.350 - 26.576.900	NBE543 + NBE544	2450 bp	
		9	26.671.456 - 26.673.630	NBE545 + NBE546	2174 bp	
		10	26.772.853 - 26.775.238	NBE547 + NBE548	2385 bp	
		11	26.882.747 - 26.885.197	NBE549 + NBE550	2450 bp	
		12	26.967.917 - 26.970.464	NBE551 + NBE552	2547 bp	

Tabelle 8-7: In der FISH-Analyse eingesetzte BACs.

Translokation	Amplikon	<i>A. thaliana</i> BACs
TL1-2	Chr1	T30F21, F9K20, T8K14, F20B17, F19K16, F18B13, F516, T21F11, F23A5
	Chr2	F13A10, T3A4, F19D11, F14M4, T8I13

8.2 Plasmide und Referenzsequenzen

8.2.1 Klonierte Vektoren

Tabelle 8-8: In dieser Arbeit klonierte Vektoren. Aufgelistet sind die in dieser Arbeit klonierten Vektoren mit den verschiedenen Promotoren und den Terminatoren, sowie die zur Klonierung verwendeten Ausgangsvektoren.

Vektorname	Promotor + Terminator	Ausgangsvektor	Selektionsmarker
<i>Entry-Vektoren</i>			
pEn-SaChimera+PS1-1	<i>AtU6-26</i>	pEn-SaChimera	--
pEn-SaChimera+PS2	<i>AtU6-26</i>	pEn-SaChimera	--
pEn-SaChimera+PS1-2	<i>AtU6-26</i>	pEn-SaChimera	--
pEn-SaChimera+PS5	<i>AtU6-26</i>	pEn-SaChimera	--
pEn-SpChimera+SSA	<i>AtU6-26</i>	pEn-Chimera	--
pEn-SpChimera+SDSA	<i>AtU6-26</i>	pEn-Chimera	--
<i>Expressionsvektoren</i>			
pDe-SaCas9+PS1-1/PS2	<i>PcUbi4-2 + pea3A</i>	pDe-SaCas9	Gentamycin
pDe-SaCas9+PS1-2/PS5	<i>PcUbi4-2 + pea3A</i>	pDe-SaCas9	Gentamycin
pDe-SaCas9-EC+PS1-1/PS2	EC1.1-enhEC1.2 + <i>rbcS-E9</i>	pDe-SaCas9-ECP(EcoRI-mut)	PPT
pDe-SaCas9-EC+PS1-2/PS5	EC1.1-enhEC1.2 + <i>rbcS-E9</i>	pDe-SaCas9-ECP(EcoRI-mut)	PPT
pDe-SpCas9-D10A+SSA	<i>PcUbi4-2 + pea3A</i>	pDe-SpCas9-D10A	Gentamycin
pDe-SpCas9-D10A+SDSA	<i>PcUbi4-2 + pea3A</i>	pDe-SpCas9-D10A	Gentamycin
<i>Kontrollplasmide</i>			
pEn+TL1-2_J1	--	pEn-Chimera	--
pEn+TL1-2_J2	--	pEn-Chimera	--

8.2.2 Referenzsequenzen

Im Folgenden aufgelistet sind die Referenzsequenzen mit den entsprechenden Annotationen im FASTA-Format für die ddPCR sowie die NGS Analyse.

>ddPCR_Reference_TL1-2_J1

```
AGGAGCCTGGACGCTAAAGAGAGAAAAGTGGAGAGAGACTATCTTCTTCAAACCTCGTAGCTATTGGACGATGATGATGATGATGATAAAGCTTGG
TTGGAAATGGGTTCCTCTTTGAGTGATTTCCGGTCGGAAGAAGGAAAGAAGGAGAGAGATTGGGAGAGAAACGCCATagctgctgatttt
agagcttctcttggttcttttggttggtttgtcttaatttttcaaggcgacttaagagaatcagagggagaggatgacgagttgagaagagcg
aagatgacgaagaagctttggttgaagataaacagctgctcgttttttgagtggtaatcaaaccttcgcggttgatTTTTTCTTTCTTTATT
ttgacttctaataTTTTTatgTTTTcttactTTTTatTTgatatactatataTTTTatTTTTctcctaagttgatctaataatgaacaaaataa
tagccacccaaaaaagaaaagaaaagcgtactaattccgacccaaaaaagaaaagcgtacgaatTTTtaattTTTTtagtaaatgatttttca
aggaaaatatttgtacatttagtaccgtaaaagtataatcttatgcatTTTaaagcagtaatttttgaaaaataaaattttcatgTTTaatctcac
atttacaatactatgtgatctTTaatgaatTTTTTTTgttattgtccttgccataaggaatTTTTTaatgcatagaaaaacataaaaaataaa
atgataagacacgtgtaaactggcctaagcccaaaaaataaaaagaccggatTTaagaaagccacactagcgatatttTgatccgTTTgaaa
ataaaaataaccacgcgactatatgCGagttatcagcagcacctcaaactctgtaggTTTaaacccctTTTTggttattaaggTgtatggtTTTga
ttgCGaaagcaactcattccgaggttattataggtgattgagTTTgctatctcttcttaattatgatttttagTTTTTTTTctccataatcctt
gtgggtttggttagagataagatatgtgatgattaatggtgagaaatTTaataaggTaaaaagcAAAatggttgagcgatatagacatcaa
aggacagtg
```

>Features ddPCR_Reference_TL1-2_J1

1	21	misc_feature	
		label	N1 Primer fw (NBE273)
278	300	misc_feature	
		label	N1 Sonde (NBE-S2, HEX)
332	354	misc_feature	
		label	N1 Primer rv (NBE135)
386	391	misc_feature	
		label	Sspl-HF
570	575	misc_feature	
		label	Sspl-HF
763	783	misc_feature	
		label	J1 Primer fw (NBE83)
908	913	misc_feature	
		label	PAM
800	824	misc_feature	
		label	J1 Sonde (NBE-S1, FAM)
914	916	misc_feature	
		label	Protospacer1-1 Chr1 SaCas9
917	933	misc_feature	
		label	Protospacer2 Chr2 SaCas9
1113	1137	misc_feature	
		label	J1 Primer rv (NBE90)

>ddPCR_Reference_TL1-2_J2

```

agatagcattcgggtcattcagcccaggcccagcattttacttgggagtagtataaccggtgcaatgcaaaaggaatgaactttcaaccagtct
aaaaccaactatattagaaatcaaagttaattatacaaacacttttcattgtttaagtgataacagttaaacaatatgtttttatcaaatat
ataattttattataaaaaaccatgcaaaaagctttcaacaacggtcctctcctcaagtacttattagtgagcttctacttgaaaatcagttaaaa
catatacttttatcacaanaacattatataatgaatactgactagatttttaatatataatataatataatataatataatataatataatgaactgactagat
tttaatatataatataatataatagtaaatgcattaagaaaatgaaaataaccatatacgtttattaccactcgaaccttcttatgtcataacc
ccagaaattcaatgtcatgtgtaaacgaatacacatgatcattcatgttaactataaattcgaatcaatccataaaaggcgaagcttcaagcataat
agattctgacccaattgtaatcacatcaaaatgatgggaaattaaatacaaaaagagaaaaattaaacagaagattccaatcacctttttatt
gattaatttctttcaaatatttgaaaaaacttttcacatttgaaacacaaaagcagactgtttttttttttttttttttgtaaaatcaga
ctgttgatataacattttttccgacatggatgtagacctcggtgggacgagcttgcaactatcccacacactaccctgaatcatcttcttg
ttattataattctataaagagctttacataaataattatctcgaccatctttgttcataatataacctcgttggtgaaaattgttagtccaat
aatcatcttcatgtagaattgtagatcgatgctggcaataaattcgcattcgggtgcattttctcaataaccattaaaattgtttatgacaacgc
tgcatggtgatggttcaaaaattaattagcttgatttggtttataaacctcccacgaaattagctattttgtatagttcgaaaagtaagcg
cgtgatgtttttttttttttttttttgtcaactagcgcgtgatgcttttaagttttttatttttttttttttttttttttgtgcttctaagt
tttaactctccctcgacttatctctgta

```

>Feature ddPCR_Referenz_TL1-2_J2

1	23	misc_feature	
		label	N3 Primer fw (NBE275)
41	63	misc_feature	
		label	N3 probe (NBE-S5, HEX)
217	241	misc_feature	
		label	N3 Primer rv (NBE276)
911	937	misc_feature	
		label	J2 Primer fw (NBE297)
966	987	misc_feature	
		label	J2 probe (NBE-S4, FAM)
1081	1086	misc_feature	
		label	PAM
1087	1089	misc_feature	
		label	Protospacer2 Chr2 SaCas9
1090	1106	misc_feature	
		label	Protospacer1-1 Chr1 SaCas9
1228	1250	misc_feature	
		label	J2 Primer rv (NBE86)

8. Anhang

>NGS_Referenz_Ch1(PS1-1)

```
TTGAGCacgtgtaaactgggcctaagcccaaaaaataaaaagaccggtattaagaaagcccacactagcgatatttggatccggttgaaaataa
aataaccacgcgcactatatgaggttatcagcagcaccctcaaatctgtaggttaacccctttcgaaattagctatTTTTGTATAGTTCGA
aaaagtaagcgcgtgatgtTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCAACTAGCGCGTGATGCTTTAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGG
tgcttctaagTTTTAACTCTCCCTCGACTTATCTCTGTAGTTAAGGAATTCGAAAAGTAATTTGCACCTAAGATCTGTAATCGTTAGCTCT
ttctagcccagttacgacaGCTCAA
```

>Feature NGS_Reference_Ch1(PS1-1)

1	27	misc_feature	
		label	RT Primer fw (NBE448)
152	157	misc_feature	
		label	PAM
158	177	misc_feature	
		label	Protospacer1-1 Chr1 SaCas9
373	401	misc_feature	
		label	RT Primer rv (NBE449)

>NGS_Referenz_Ch1(PS1-2)

```
CAATAGCgatttcagccggtagtgggtaaacgggtatcgagaattagtggaacgtctcgggtttgggtacagaataaaatcttctatcagatt
cctacataattagaattagaaaaccgaaaaatgcaaatacaaaaacaaacaaattcataaattcttctaactaataatgccaaatatatcttta
tctcttcaaaatcacactaaacgagctacgtctataaagtatcataactttgagtttagtaaccactagttaacccgagtaactaactgacttg
ataaccttccggttgagtaatcgatcttcaatggattctataatcgaaataaattatcaacaaataaatacaaaatcgatctataatcgctatga
gttgaaaccagcacttggttcaacttaaccgctcctgaagacttcagaaccggcatcaatctttggtCTATTG
```

>Feature NGS_Reference_Ch1(PS1-2)

1	27	misc_feature	
		label	NGS_Primer fw (NBE420)
250	255	misc_feature	
		label	PAM
256	275	misc_feature	
		label	Protospacer1-2 Chr1 SaCas9
420	448	misc_feature	
		label	NGS_Primer rv (NBE421)

>NGS_Referenz_Ch2(PS2)

```
TGTAATcctcgttgtgaaaattgtagtccaataatcatcttcatgtagaattgtagatcgatgtcggcaataaattcgcattcgggtgcattt
tctcaataaccattaaatttgTTTTATGACAACGCTGCATGGTTGATGGTTCAAAAATTAATTAGCTTGATTTGGTTTATAACCCCTCCCATGGTT
attaaggtgatggtttgattgCGAAAGCAACTCATTCCGAGGTTATTATAGGTGATTGAGTTGGCTATCTCTTTCTAATTATGATTTTAGTTT
TTTTTCTCCATAATCCTTGTGGTTTGTAGAGATAAGATATGTGTATGATTAATGGTGAGAAATTTAATAAAGGTAAGAGCAAAATGGT
tgagcgatatagacatcaaggacagtgATTACA
```

>Feature NGS_Reference_Ch2(PS2)

1	31	misc_feature	
		label	Primer fw (NBE458)
175	180	misc_feature	
		label	PAM
181	200	misc_feature	
		label	Protospacer2 Chr2 SaCas9
380	410	misc_feature	
		label	RT Primer rv (NBE459)

8. Anhang

>NGS_Referenz_Ch5(PS5)

```
GCACATtctatatttcgactccgccactggctccttcttgcgattagatttgacgttttaagtttgtagatgaccgacgagacgcgaaagcata
gcacgtgtgcatcagtgcttctactgtgatggcaaaagcaaacccaatattttctaaccaaagcgtatttattgtttgtgaaactaaactg
ctatgtctccgacaaaaaatgggcaaatttaccataaatagttttcttttaacgattaagtaaatgtacatgtagtaaaaaattggacatg
taaatgatgtggatgcaccgaATGTGC
```

>Feature NGS_Reference_Ch5(PS5)

1	29	misc_feature	
		label	NGS_Primer fw (NBE428)
137	142	misc_feature	
		label	PAM
143	162	misc_feature	
		label	Protospacer3 Chr5 SaCas9
209	240	misc_feature	
		label	ChrV_T-RTPPr1 (ALI-40) funktioniert nicht!
282	309	misc_feature	
		label	NGS_Primer rv (NBE429)

>NGS_Referenz_TL1-2-J1

```
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGacgtgtaaaactgggcctaagcccaaaaaataaaaagaccggtattaagaaagcccacacta
gcgatatttgatccgtttgaaaataaaaataaccacgcgcactatagcaggttatcagcagcacctcaaatctgtaggtttaacccccctttt
ggttattaagggtgatggtttgattgcaaaagcaactcattccgaggttattataggtgattgagttggctatctctttctaattatgatttta
gtttttttttctccataatccttggtgggtttgtagagataagatatggtgatgattaatggtgagaaatthaataaaggtaaaaagagcaaaa
tggttgagcgatagacatcaaggacagtCTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC
```

>Feature NGS_Reference_TL1-2-J1

1	54	misc_feature	
		label	Primer fw (NBE484)
179	184	misc_feature	
		label	PAM
185	187	misc_feature	
		label	Protospacer1-1 Ch1 SaCas9
188	204	misc_feature	
		label	Protospacer2 Chr2 SaCas9
384	442	misc_feature	
		label	Primer rv (NBE485)

>NGS_Referenz_TL1-2-J2

```
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGaccctcggttgtaaaattgtagtccaataatcatcttcatgtagaattgtagatcgatg
tcggcaataaattcgcatcgggtgcattttctcaataaccattaaatttgttatgacaacgctgcatggttgatggttcaaaaattaattagc
ttgatttggtttataaccctcccacgaaattagctatTTTTTGTATAGTTGAAAAAGTAAGCGCGTGATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCA
actagcgcgtagctctttaaagtttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
TCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC
```

>Feature NGS_Reference_TL1-2-J2

1	60	misc_feature	
		label	Primer fw (NBE486)
204	209	misc_feature	
		label	PAM
210	212	misc_feature	
		label	Protospacer2 Chr2 SaCas9
213	229	misc_feature	
		label	Protospacer1-1 Chr1 SaCas9
351	407	misc_feature	
		label	Primer rv (NBE487)

8.3 Quellcode für die Analyse von NGS-Daten in R-Studio

```

# Einmalig ausführen
  install.packages("stringr")
  install.packages("dplyr")
  install.packages("openxlsx", dependencies = TRUE)

# Konfiguration
importFolder "V:/Doktorarbeit/PROJEKTE/Deletionen Inversionen mit CRISPR/NextGen/importFiles"
exportFolder "V:/Doktorarbeit/PROJEKTE/Deletionen Inversionen mit CRISPR/NextGen/results"
importFileName "TT4B Deletion Ku70"
importFileType ".txt"

# Initialisierung
  library(stringr)
  library(dplyr)
  library(openxlsx)
  if(!dir.exists(exportFolder)) {
    dir.create(exportFolder)
    print('Creating Export Folder')
  }

# Einlesen der Quell-Datei
print(paste("Importing ", importFolder, "/", importFileName, importFileType, sep=""))
importResultAll <- read.delim(paste(importFolder, "/", importFileName, importFileType, sep=""))

print("Starting Analyses")

# Gesamtstatistik initialisieren
stats <- data.frame("X" = c('AnzahlSequenzen','SummeReads'), stringsAsFactors=FALSE)
stats[["Gesamt"]] <- c(length(importResultAll$Count), sum(importResultAll$Count))

# Wildtyp Statistik ermitteln
resultWT <- filter(importResultAll, Type == "WT or Sub")
stats[["Wildtyp"]] <- c(length(resultWT$Count), sum(resultWT$Count))
# Laenge der WT Sequenz ermitteln
  WTLaenge <- {str_count(resultWT[1,2], "[TAGC]+?")}

# Insertionen
resultIns <- filter(importResultAll, Type == "Ins")
#InDels extrahieren & in temp. Data Frame schreiben
inDelPattern <- "[TAGC]+?([-+)[TAGC]*?"
resultIns[["DelCount"]] <- {str_count(resultIns$RGEN.Treated.Sequence, inDelPattern)}
resultInsTemp <- filter(resultIns, DelCount > 0)
#Tatsaechliche Insertionen filtern
resultIns <- filter(resultIns, DelCount == 0)
resultIns[["InsSize"]] <- {resultIns$Length - WTLaenge}
stats[["Insertions"]] <- c(length(resultIns$Count), sum(resultIns$Count))
insStatistic <- summarise(group_by(resultIns, InsSize), Anzahl = n(), Reads = sum(Count))
#Auswertung der Insertionen nach Groessen-Cluster
getSizeCluster <- function(x) {
  if(is.na(x)){
    return("NA, kein Wert angegeben")
  } else if(x < 1) {
    return("kleiner 1 bp")
  } else if(x <= 10) {
    return("1-10 bp")
  } else if(x <= 50) {
    return("11-50 bp")
  } else if(x > 50) {
    return("groesser 50 bp")
  }
}
ins2Statistic <- insStatistic
ins2Statistic[["SizeCluster"]] <- apply(ins2Statistic[["InsSize"]], 1, function(x)
  getSizeCluster(x))
ins2Statistic <- summarise(group_by(ins2Statistic, SizeCluster), Anzahl = sum(Anzahl), Reads =
  sum(Reads))

```

8. Anhang

```
# Deletionen
resultDel <- filter(importResultAll, Type == "del")
#Anzahl Deletions-Patterns pro Sequenz ermitteln
delPattern <- "[TAGC]?+([-+)]?TAGC*?"
resultDel[["DelCount"]] <- {str_count(resultDel$RGEN.Treated.Sequence,delPattern)}
#InDels extrahieren, InDels aus Insertionen ergaenzen & Statistik ermitteln
resultInDels <- rbind(resultInsTemp,filter(resultDel, DelCount > 1))
stats[["InDels"]] <- c(length(resultInDels$Count),sum(resultInDels$Count))
#Tatsaechliche Deletionen extrahieren, Laenge & Statistik ermitteln
resultTrueDels <- filter(resultDel, DelCount == 1)
resultTrueDels[["DelSize"]] <- {WTLaenge - resultTrueDels$Length}
stats[["Deletions"]] <- c(length(resultTrueDels$Count),sum(resultTrueDels$Count))
delStatistic <- summarise(group_by(resultTrueDels,DelSize),Anzahl = n(),Reads =
  sum(Count))
del2Statistic <- delStatistic
del2Statistic[["SizeCluster"]] <- apply(del2Statistic["DelSize"],1,function(x)
  getSizeCluster(x))
del2Statistic <- summarise(group_by(del2Statistic,SizeCluster),Anzahl = sum(Anzahl),Reads
  =sum(Reads))

# True Deletions Detailanalyse
print("Starting Detail Analyses of Deletions")
analyzeSetDels <- resultTrueDels
# View(analyzeSetDels)
getDelLength <- function(x) {
  delPos <- str_locate(x,"(-)+")
  delLength <- delPos[2]-delPos[1]+1
  return(delLength)
}
getDeletedSeq <- function(x) {
  delPos <- str_locate(x[2],"(-)+")
  delLength <- delPos[2]-delPos[1]+1
  deletedSeq <- str_sub(x[1],delPos[1],delPos[2])
  return( deletedSeq)
}
getFollowingSeq <- function(x) {
  delPos <- str_locate(x[2],"(-)+")
  delLength <- delPos[2]-delPos[1]+1
  followSeq <- str_sub(x[1],delPos[1]+delLength,delPos[2]+delLength)
  return(followSeq)
}
getMHSize <- function(x) {
  st1 <- "";
  st2 <- "";
  for (i in c(0:str_length(x[1])-1))
  {
    st1 <- str_sub(x[1],1,i+1)
    st2 <- str_sub(x[2],1,i+1)
    if (st1 != st2) {break}
  }
  return(i)
}

analyzeSetDels[["delLength"]] <- apply(analyzeSetDels[,1],function(x) getDelLength(x))
analyzeSetDels[["deletedSeq"]] <- apply(analyzeSetDels[,c(2,3)],1,function(x)
  getDeletedSeq(x))
analyzeSetDels[["followingSeqWT"]] <- apply(analyzeSetDels[,c(2,3)],1,function(x)
  getFollowingSeq(x))
analyzeSetDels[["followingSeqTR"]] <- apply(analyzeSetDels[,c(3,3)],1,function(x)
  getFollowingSeq(x))
analyzeSetDels[["MHSize"]] <-
  apply(analyzeSetDels[,c("deletedSeq","followingSeqWT")],1,function(x) getMHSize(x))
# View(analyzeSetDels)
```

8. Anhang

```
# Detailstatistik zu Deletions
detailsDeletions <- analyzeSetDels
  getMHCluster <- function(x) {
    if(x == 0) return(0)
    if(x == 1) return(1)
    if(x == 2) return(2)
    if(x == 3) return(3)
    if(x == 4) return(4)
    if(x == 5) return(5)
    if(x == 6) return(6)
    if(x == 7) return(7)
    if(x == 8) return(8)
    if(x == 9) return(9)
    if(x >= 10) return("mind. 10")
  }
  getDelSizeCluster <- function(x) {
    if(x < 10) return("0-9")
    if(x >= 10) return("mind. 10")
  }
  getDelCluster <- function(x) {
    if(x[1] == 0) {
      if(x[2] == "mind. 10") {return("Rep. ohne MH, Del >= 10 BP")}
      else {return("Rep. ohne MH, Del < 10 BP")}
    }
    else return(paste("Rep. mit MH ",x[1]," BP"))
  }
  detailsDeletions[["MHSizeCluster"]] <- apply(detailsDeletions[["MHSize"]],1,function(x)
    getMHCluster(x))
  detailsDeletions[["DelSizeCluster"]] <- apply(detailsDeletions[["delLength"]],1,function(x)
    getDelSizeCluster(x))
  detailsDeletions[["DelCluster"]]<-apply(detailsDeletions[,c("MHSizeCluster",
    "DelSizeCluster")], 1, function(x) getDelCluster(x))
  delDetailStatistic <- summarise(group_by(detailsDeletions,DelCluster),Anzahl = n(),Reads =
    sum(Count))
  delDetailStatistic2 <-summarise(group_by(detailsDeletions,MHSizeCluster,DelSizeCluster),
    Anzahl = n(),Reads = sum(Count))
  delDetailStatistic2 <- data.frame(delDetailStatistic2)
#View(detailsDeletions)
#View(delDetailStatistic)
#View(delDetailStatistic2)

# Gesamtstatistik verifizieren und finalisieren
print("Finalizing Stats")
stats[["CheckGesamtSumme"]] <- c(
  stats[1,"Gesamt"] == stats[1,"Wildtyp"] +stats[1,"InDels"] +stats[1,"Insertions"]
  +stats[1,"Deletions"],
  stats[2,"Gesamt"] == stats[2,"Wildtyp"] +stats[2,"InDels"] +stats[2,"Insertions"]
  +stats[2,"Deletions"]
)
stats[["CheckInsStatistic"]] <- c(
  stats[1,"Insertions"] == sum(insStatistic$Anzahl),
  stats[2,"Insertions"] == sum(insStatistic$Reads)
)
stats[["CheckDelStatistic"]] <- c(
  stats[1,"Deletions"] == sum(delStatistic$Anzahl),
  stats[2,"Deletions"] == sum(delStatistic$Reads)
)
#View(stats)
```

8. Anhang

```
# Datei-Exporte
print("Prepare Exporting")
exportExcelFileName <- paste(importFileName, ".xlsx", sep="")

wb <- createWorkbook()

addWorksheet(wb, "Gesamtstatistik")
addWorksheet(wb, "insStatistic")
addWorksheet(wb, "delStatistic")
addWorksheet(wb, "delDetailStatistic")
addWorksheet(wb, "delDetailStatistic2")
addWorksheet(wb, "InDels")
addWorksheet(wb, "Deletions")
addWorksheet(wb, "Insertions")
addWorksheet(wb, "DeletionsDetails")

writeData(wb, "Gesamtstatistik", stats)
writeData(wb, "insStatistic", insStatistic)
writeData(wb, "Insertions", resultIns)
writeData(wb, "insStatistic", ins2Statistic, startCol = 5, startRow = 1)
writeData(wb, "delStatistic", delStatistic)
writeData(wb, "delStatistic", del2Statistic, startCol = 5, startRow = 1)
writeData(wb, "delDetailStatistic", delDetailStatistic)
writeData(wb, "delDetailStatistic2", delDetailStatistic2)
writeData(wb, "InDels", resultInDels)
writeData(wb, "Deletions", resultTrueDels)
writeData(wb, "DeletionsDetails", analyzeSetDels)

print(paste('Start Exporting to ', file.path(exportFolder, exportExcelFileName)))
saveWorkbook(wb, file.path(exportFolder, exportExcelFileName), overwrite = TRUE)
print('Exporting finished')
print('Execution Finished')
```

8.4 Rohdaten

8.4.1 ddPCR Analyse der TL1-2

Tabelle 8-9: Rohdaten der ddPCR Analysen. Dargestellt sind die Ergebnisse der ddPCR-basierten Analyse im Col-0 wie auch im *ku70-1* Hintergrund. Angegeben sind die berechneten TL-Frequenzen aller biologischen Replikate als prozentualer Anteil der TL-Ereignisse (Kopien/ μ L, FAM) an der Gesamtmenge an eingesetzter DNA (Kopien/ μ L, HEX) abzüglich der falsch-positiven in der NTC (*non-template control*).

ddPCR	Probe	Amplikon	Threshold	Konz. (Kopien/ μ L)	TL-Frequenz
TL1-2 J1: Col-0 Replikate 1-6					
NBE52	TL1-2 Col-0_1	TL1 (FAM)	5300	0,51	
		N1 (HEX)	1700	3.667,43	0,0133%
	TL1-2 Col-0_2	TL1 (FAM)	5300	0,33	
		N1 (HEX)	1700	7.443,09	0,0040%
	TL1-2 Col-0_3	TL1 (FAM)	5300	0,81	
		N1 (HEX)	1700	6.806,46	0,0115%
	NTC	TL1 (FAM)	5300	0,03	
		N1 (HEX)	1700	0,00	
ddPCR64					
ddPCR64	TL1-2 Col-0_4	TL1 (FAM)	5300	0,10	
		N1 (HEX)	1700	842,10	0,0098%
	TL1-2 Col-0_5	TL1 (FAM)	5300	0,12	
		N1 (HEX)	1700	471,13	0,0210%
	TL1-2 Col-0_6	TL1 (FAM)	5300	0,18	
		N1 (HEX)	1700	5.001,13	0,0033%
	NTC	TL1 (FAM)	5300	0,02	
		N1 (HEX)	1700	0,04	
TL1-2 J2: Col-0 Replikate 1-6					
ddPCR53	TL1-2 Col-0_1	TL2 (FAM)	2400	0,15	
		N3 (HEX)	1500	3.363,08	0,0039%
	TL1-2 Col-0_2	TL2 (FAM)	2400	0,52	
		N3 (HEX)	1500	2.465,70	0,0203%
	TL1-2 Col-0_3	TL2 (FAM)	2400	0,12	
		N3 (HEX)	1500	5.555,67	0,0018%
	NTC	TL2 (FAM)	2400	0,00	
		N3 (HEX)	1500	0,00	
ddPCR66					
ddPCR66	TL1-2 Col-0_4	TL2 (FAM)	2400	0,12	
		N3 (HEX)	1500	842,06	0,0109%
	TL1-2 Col-0_5	TL2 (FAM)	2400	0,05	
		N3 (HEX)	1500	406,68	0,0070%
	TL1-2 Col-0_6	TL2 (FAM)	2400	0,05	
		N3 (HEX)	1500	4.743,62	0,0005%
	NTC	TL2 (FAM)	2400	0,02	
		N3 (HEX)	1500	0,00	

8. Anhang

Fortsetzung Tabelle 8-9: Rohdaten der ddPCR Analysen.

ddPCR	Probe	Amplikon	Threshold	Konz. (Kopien/ μ L)	TL-Frequenz
TL1-2 J1: <i>ku70-1</i> Replikate 1-6					
NBE55	TL1-2 ku70_1	TL1 (FAM)	5300	2,19	
		N1 (HEX)	1700	4.041,66	0,0541%
	TL1-2 ku70_2	TL1 (FAM)	5300	0,96	
		N1 (HEX)	1700	2.586,64	0,0372%
	NTC	TL1 (FAM)	5300	0,00	
		N1 (HEX)	1700	0,00	
ddPCR69	TL1-2 ku70_3	TL1 (FAM)	5300	1,04	
		N1 (HEX)	1700	3.632,15	0,0287%
	TL1-2 ku70_4	TL1 (FAM)	5300	0,71	
		N1 (HEX)	1700	3.531,60	0,0202%
	NTC	TL1 (FAM)	5300	0,00	
		N1 (HEX)	1700	0,03	
ddPCR71	TL1-2 ku70_5	TL1 (FAM)	5300	1,63	
		N1 (HEX)	1700	1.832,09	0,0887%
	NTC	TL1 (FAM)	5300	0,00	
		N1 (HEX)	1700	0,00	
ddPCR75	TL1-2 ku70_6	TL1 (FAM)	5300	0,48	
		N1 (HEX)	1700	762,23	0,0402%
	NTC	TL1 (FAM)	5300	0,17	
		N1 (HEX)	1700	0,02	
TL1-2 J2: <i>ku70-1</i> Replikate 1-6					
NBE56	TL1-2 ku70_1	TL2 (FAM)	2200	1,19	
		N3 (HEX)	1500	4.327,37	0,0275%
	TL1-2 ku70_2	TL2 (FAM)	2200	0,54	
		N3 (HEX)	1500	2.486,36	0,0217%
	NTC	TL2 (FAM)	2200	0,00	
		N3 (HEX)	1500	0,00	
ddPCR70	TL1-2 ku70_3	TL2 (FAM)	2200	3,22	
		N3 (HEX)	1500	6.308,93	0,0507%
	TL1-2 ku70_4	TL2 (FAM)	2200	2,94	
		N3 (HEX)	1500	2.008,36	0,1452%
	NTC	TL2 (FAM)	2200	0,02	
		N3 (HEX)	1500	0,04	
ddPCR71	TL1-2 ku70_5	TL2 (FAM)	2200	0,87	
		N3 (HEX)	1500	1.788,62	0,0488%
	NTC	TL2 (FAM)	2200	0,00	
		N3 (HEX)	1500	0,00	
ddPCR75-2	TL1-2 ku70_6	TL2 (FAM)	2200	0,32	
		N3 (HEX)	1500	702,89	0,0433%
	NTC	TL2 (FAM)	2200	0,02	
		N3 (HEX)	1500	0,00	

8.4.2 NGS-Daten

Die NGS Sequenzdaten zur Analyse der Cas9-Schnitteffizienzen sind unter den *Sequence Read Archive* (SRA) Zugangsnummern SAMN14339870 (Cas9 efficiency), zur Analyse der TL-Junctions sind unter den SRA Zugangsnummern SAMN14134373 (TL1-2_Col0), SAMN14134374 (TL1-2_ku70) online zu finden.

Tabelle 8-10: Rohdaten der NGS Analyse – Cas9-Schnitteffizienz.

		Gesamt	Wildtyp	Verändert	Deletionen	Insertionen	InDels
Chr1 (PS1-1)	Summe reads	4507	1139	3373	129	3242	2
Chr2 (PS2)	Summe reads	72219	7449	64770	18535	45801	434
Chr1 (PS1-2)	Summe reads	75216	14103	61113	28262	31804	1047
Chr5 (PS3)	Summe reads	82683	68068	14615	2519	12084	12

Tabelle 8-11: Rohdaten der NGS Analyse – Analyse der TL-Junctions.

			Gesamt	Wildtyp	Verändert	Deletionen	Insertionen	InDels
TL1-2 J1	Col-0	Summe reads	161417	96356	65061	52281	8868	3912
	ku70-1	Summe reads	147776	495	147281	12711	3177	131393
TL1-2 J2	Col-0	Summe reads	634	312	322	37	51	234
	ku70-1	Summe reads	5887	4	5883	3867	3	2013

Tabelle 8-12: Rohdaten der NGS Analyse – Deletionsgrößen, Insertionsgrößen und zur Reparatur verwendete Mikrohomologien (MH).

		Deletionen			
		Gesamt Del.	Deletion 1-10 bp	Deletion 11-50 bp	Deletion > 50 bp
TL1-2 J1	Col-0	52281	20844	30569	868
	ku70-1	12711	934	10232	1545
TL1-2 J2	Col-0	37	28	8	1
	ku70-1	3867	2	266	3599

		Insertionen			
		Gesamt Ins.	Insertion 1-10 bp	Insertion 11-50 bp	Insertion > 50 bp
TL1-2 J1	Col-0	8868	5897	2316	655
	ku70-1	3177	146	2798	233
TL1-2 J2	Col-0	51	3	10	38
	ku70-1	3	0	0	3

		Mikrohomologien			
		Gesamt MH	Fehlerfreie Ligation	Reparatur ohne MH	Reparatur mit MH
TL1-2 J1	Col-0	161417	96356	43228	21833
	ku70-1	147776	495	7187	140094
TL1-2 J2	Col-0	634	312	309	13
	ku70-1	5887	4	3165	2718

8.4.3 Fertilitätsanalysen

Tabelle 8-13: Fertilitätsanalyse von zwei für die TL1-2 homozygoten Linien (Col-0::EC-TL1-2). Aufgeführt sind die ermittelte Schotenlänge und die Anzahl der Samen pro Schote von zwei TL-Linien homozygot für TL1-2 im Vergleich zum Wildtyp (WT). Die Ergebnisse sind in zwei Säulendiagrammen in Abbildung 3-11 dargestellt.

Linie	Schotenlänge [cm]					Samenanzahl pro Schote						
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 5	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 5		
Col-0	#1	1,3	1,3	1,4	1,3	1,1	52	48	53	45	39	
	#2	0,9	1,3	1,1	1,3	1,2	15	49	33	48	42	
	#3	1,2	1,2	1,1	1,3	1,2	53	34	41	50	48	
	#4	1,2	1,4	1,0	1,0	1,1	47	54	25	20	42	
	#5	1,1	1,3	1,2	1,4	1,1	36	39	49	57	46	
	Mittelwerte	1,14	1,30	1,16	1,26	1,33	1,20	40,6	44,8	40,2	44,0	42,8
Standardabw.						0,07						1,82
Col-0 ::EC-TL1-2	#1	1,3	1,4	1,2	1,3	1,2	47	47	36	51	43	
	#2	1,2	0,6	1,1	1,3	1,2	38	3	45	42	53	
	#3	1,4	0,9	1,2	1,3	1,2	54	8	55	45	40	
	#4	1,2	1,2	1,1	1,3	1,1	40	33	51	58	45	
	#5	1,3	1,2	1,2	1,0	1,3	48	42	39	14	50	
	Mittelwerte	1,28	1,06	1,16	1,24	1,20	1,19	45,4	26,6	45,2	42,0	46,2
Standardabw.						0,08						7,38
t-Test p-Wert						0,84						0,73
Col-0 ::EC-TL1-2	#1	1,0	1,0	1,1	1,2	1,2	38	20	23	47	40	
	#2	1,1	1,3	1,3	1,3	1,3	41	43	48	45	51	
	#3	1,2	1,3	1,3	1,3	1,2	34	42	54	50	49	
	#4	1,2	1,2	1,4	1,3	1,1	33	52	28	43	38	
	#5	1,1	1,1	1,3	1,3	1,2	21	39	46	49	54	
	Mittelwerte	1,12	1,18	1,28	1,28	1,20	1,21	33,4	39,2	39,8	46,8	46,4
Standardabw.						0,06						5,00
t-Test p-Wert						0,78						0,63

8. Anhang

Tabelle 8-14: Fertilitätsanalyse von einer für die TL1-5 homozygoten Linien (Col-0::EC-TL1-5). Aufgeführt sind die ermittelte Schotenlänge und die Anzahl der Samen pro Schote von einer TL-Linie homozygot für TL1-5 im Vergleich zum Wildtyp (WT). Die Ergebnisse sind in zwei Säulendiagrammen in Abbildung 3-15 dargestellt.

Linie	Schotenlänge [cm]					Samenanzahl pro Schote						
	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 5	Pflanze 1	Pflanze 2	Pflanze 3	Pflanze 4	Pflanze 5		
Col-0	#1	1,2	1,1	1,2	0,9	0,7	37	43	39	15	4	
	#2	1,1	1,4	1,2	1,2	1,3	32	43	37	48	40	
	#3	1,2	1,5	1,2	1,2	1,4	40	53	40	36	37	
	#4	1,2	1,1	1,1	1,2	1,2	37	42	33	35	38	
	#5	1,2	0,7	0,9	1,3	1,3	37	8	21	34	45	
	Mittelwerte	1,18	1,16	1,12	1,16	1,18	1,16	36,6	37,8	34,0	33,6	32,8
Standardabw,						0,02						1,91
Col-0 ::EC-TL1-5	#1	1,3	1,1	1,2	1,6	1,2	50	42	42	56	31	
	#2	1,5	1,6	1,4	1,3	1,3	52	60	52	31	43	
	#3	1,6	1,3	1,4	1,2	1,2	54	50	43	44	38	
	#4	1,2	1,5	1,2	1,3	1,3	36	54	36	44	42	
	#5	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	36	32	35	40	33	
	Mittelwerte	1,36	1,34	1,28	1,32	1,24	1,31	45,6	47,6	41,6	43,0	37,4
Standardabw,						0,04						3,50
t-Test p-Wert						0,0009						0,006

8.4.4 Nachweis der β -Glucuronidase Aktivität

Tabelle 8-15: Rohdaten des 4-MUG Assays. Angegeben sind die relativen Fluoreszenzintensitäten von je drei Replikaten der untersuchten Linien zu je drei Zeitpunkten (10, 20, 30 min).

NBE829 = DGU.US::Cas9-D10A						
min	Repl 1 – FI	Repl 2 – FI	Repl 3 – FI	Repl 1 – nmol	Repl 2 – nmol	Repl 3 – nmol
10	8872	10610	9939	240.3	327.9	320.8
20	17966	21034	17048	698.8	853.5	672.8
30	27609	31746	25547	1185.1	1393.7	1093.7
Steigung				47.24	53.29	38.64
NBE836 = rad54-1_DGU.US::Cas9-D10A						
min	Repl 1 – FI	Repl 2 – FI	Repl 3 – FI	Repl 1 – nmol	Repl 2 – nmol	Repl 3 – nmol
10	12258	9768	12172	411.0	285.4	431.4
20	25754	19281	23704	1091.5	765.1	1002.4
30	37245	28861	36988	1671.0	1248.2	1660.2
Steigung				63.00	48.14	61.44
NBE837 = rad5a-2_DGU.US::Cas9-D10A						
min	Repl 1 – FI	Repl 2 – FI	Repl 3 – FI	Repl 1 – nmol	Repl 2 – nmol	Repl 3 – nmol
10	9127	5960	11792	253.1	93.4	412.6
20	17757	11938	23775	688.3	394.9	1005.9
30	26479	17623	35111	1128.1	681.5	1567.3
Steigung				43.75	29.41	57.73
NBE830 = IU.GUS::Cas9-D10A						
min	Repl 1 – FI	Repl 2 – FI	Repl 3 – FI	Repl 1 – nmol	Repl 2 – nmol	Repl 3 – nmol
10	346	531	1070	-187.3	-177.2	-118.3
20	680	1108	2347	-169.1	-145.8	-55.1
30	932	1654	3513	-155.4	-116.0	2.6
Steigung				1.60	3.06	6.05
NBE198 = rad54-1_IU8::Cas9-D10A						
min	Repl 1 – FI	Repl 2 – FI	Repl 3 – FI	Repl 1 – nmol	Repl 2 – nmol	Repl 3 – nmol
10	1510	822	667	-123.8	-161.4	-138.3
20	2863	1564	1403	-50.0	-120.9	-101.8
30	4165	2241	2141	21.0	-84.0	-65.3
Steigung				7.24	3.87	3.65
NBE199 = rad5a-2_IU8::Cas9-D10A						
min	Repl 1 – FI	Repl 2 – FI	Repl 3 – FI	Repl 1 – nmol	Repl 2 – nmol	Repl 3 – nmol
10	1182	1073	314	-141.7	-147.7	-155.8
20	2400	2131	834	-75.3	-90.0	-130.0
30	3486	3281	1272	-16.1	-27.3	-108.3
Steigung				6.28	6.02	2.37

8. Anhang

Tabelle 8-16: Rohdaten des Lowry Assays. Angegeben sind die Proteinkonzentrationen der drei Replikate der jeweiligen analysierten Linie in $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$.

Linie	Repl 1	Repl 2	Repl 3
DGU.US	40.49	51.75	52.66
<i>rad54-1</i> _DGU.US::Cas9-D10A	58.66	44.72	30.23
<i>rad5a-2</i> _DGU.US::Cas9-D10A	39.73	54.58	49.90
IU.GUS	20.34	30.00	29.44
<i>rad54-1</i> _IU8::Cas9-D10A	38.92	38.30	43.58
<i>rad5a-2</i> _IU8::Cas9-D10A	48.53	44.57	27.44

Eidesstattliche Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Botanischen Institut, Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie, des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der Zeit von September 2015 bis Februar 2020 durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie in der gültigen Fassung vom 24. Mai 2018 wurden beachtet. Die elektronische Version der vorliegenden Arbeit stimmt mit der schriftlichen Arbeit überein. Weiterhin ist die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. 1 § 3 der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Institutes für Technologie beim Institut gesichert.

Ort, Datum

Natalja Beying

Ende
