

Genetische Veränderung von Tabak mittels Zielsequenz-spezifischer Endonukleasen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Diplombiologin Sindy Schedel

geboren am 11.12.1987 in Pößneck

2017

Referent: Prof. Dr. Thomas Debener
Korreferentin: Prof. Dr. Traud Winkelmann
Tag der Promotion: 24.03.2017

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
(IPK Gatersleben) in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie angefertigt.

Zusammenfassung

Schlagworte: *Genome Engineering*, sequenzspezifische Mutagenese, Mutationserhaltung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung des *Genome Engineerings* mittels *Transcription Activator-Like Effector* Nukleasen (TALEN) sowie RNA-vermittelten Cas9-Endonukleasen (gRNA/Cas9) in den Tabakarten *Nicotiana benthamiana* und *N. tabacum*. Die Zielsequenz-spezifisierbaren Endonukleasen induzieren Modifikationen an genomischen DNA Sequenzen und repräsentieren die neueste Generation gezielter genetischer Veränderungen. Sowohl *N. tabacum* als auch *N. benthamiana* sind vielseitig verwendete experimentelle Modellpflanzen mit guter Transformierbarkeit und wurden deshalb für die Etablierung der TALEN und gRNA/Cas9 Technologien ausgewählt, um diese für die nachfolgende Nutzung in Kulturpflanzen zu erschließen.

Vorbereitend wurden Endonuklease-Konstrukte für die entsprechenden Zielregionen designt, kloniert und anschließend per Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in das Genom regenerationsfähiger Zellen von Blattsegmenten übertragen. Für die Etablierung dieser Technologien wurde zunächst das Reportergen *gfp* als Ziel verwendet und dafür eine vorab verfügbare *gfp* Einzelkopie-Linie von *N. tabacum* ausgewählt und mit den Zielsequenz-spezifisierten Endonuklease-Konstrukten re-transformiert. Sowohl die TALEN als auch die gRNA/Cas9 Technologie konnte in Tabak etabliert werden, wobei Letztere wesentlich effizienter zur Induktion von Mutationen führte. Die *gfp* Mutanten wurden mittels Sequenzierung der Zielregion identifiziert und charakterisiert. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Vererbbarkeit der erzielten *gfp* Mutationen im Vergleich von Selbstung, vegetativer Vermehrung und der Herstellung doppelhaploider Nachkommen. Ein großer Anteil gRNA/Cas9-induzierter Mutationen wurde an die Folgegenerationen vererbt und mittels Haploidentechnologie besonders effizient fixiert. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass Mutationen auch durch vegetative Vermehrung erhalten werden können und dass solche Mutationen, die keine Verschiebung des translationalen Leserahmens verursachen, zu einer attenuierten Proteinfunktion führen können, was insbesondere für Studien mit Genen von Interesse ist, die für die Pflanze essentiell sind.

In einem nachfolgenden Experiment wurde das endogene zentromerspezifische Histon 3 (*CENH3*) Gen aus *N. benthamiana* gezielt durch gRNA/Cas9 modifiziert, während keine durch TALENs induzierten Mutationen mittels Sequenzierung identifiziert und charakterisiert werden konnten. *CENH3* ist ein für den Kinetochorkomplex essentielles Protein, welches bei Zellteilungen für die Aufteilung der Schwesterchromatiden von zentraler Bedeutung ist. Ein funktioneller Knock-out führt deshalb zu Letalität. Daher bestand eine weitere Aufgabe darin chimäre *CENH3*-Derivate aus der Histonfaltungsdomäne des nativen *NbCENH3* und verschiedenen N-Termini zu assemblieren, die für eine partielle Komplementierung verwendet wurden. Resultierende Linien mit eingeschränkter

CENH3-Funktionalität sollen als Ausgangsmaterial für die nachfolgende Entwicklung einer neuen, auf uniparentaler Genomeliminierung basierenden Haploidentechnologie bereitgestellt werden.

Summary

Keywords: genome engineering, site-directed mutagenesis, mutant fixation

The following work describes the establishment of genome engineering in *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum* by means of the transcription activator-like effector nuclease (TALEN) and RNA-guided Cas9-endonuclease (gRNA/Cas9) platforms. These customizable endonucleases are able to induce site-specific genomic modifications and represent the new frontier in genome engineering. *N. tabacum* as well as *N. benthamiana* are widely used experimental model plants with good transformation efficiency; hence they were chosen for the implementation of the TALEN and RNA-guided Cas9 technologies to be made available for subsequent utilization in crop plants.

Firstly, endonuclease constructs were designed to target a specific sequence, cloned and integrated into the genome of regenerable cells of leaf segments via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. For the establishment of these technologies, *gfp* was used as target gene. Towards this end, a *gfp* single copy tobacco line was identified from previously produced material and retransformed with site-specific endonuclease constructs. The establishment of the TALEN as well as the RNA-guided Cas9 technology in tobacco revealed that the latter approach is by far more efficient in the induction of mutations. *Gfp* mutant plants were identified and characterized by sequencing the target region. Furthermore, the heritability of induced mutations was examined using progeny of self-fertilized plants and regenerants from *in vitro* cultured embryogenic pollen as well as from vegetative propagation. RNA-guided Cas9-induced mutations were transmitted to the progeny and particularly efficiently fixed using haploid technology. Moreover, it was demonstrated that mutations can be maintained via vegetative propagation and that in-frame mutations can be used to attenuate protein function, which is particularly beneficial for studies on genes that are essential for the plant.

In a subsequent experiment, the endogenous gene of the centromere-specific histone 3 (*CENH3*) of *N. benthamiana* was modified by site-specific RNA-guided Cas9, while the use of TALENs did not result in detectable mutations. The RNA-guided Cas9-induced mutant plants were also identified and characterized by sequencing the target site. *CENH3* is an essential protein of the kinetochore complex, which plays a central role in the allocation of the sister chromatids during cell division. Therefore a functional knock-out causes lethality. Hence an additional task was to assemble chimeric *CENH3*-derivatives, consisting of the histone fold domain of the native *NbCENH3* coupled to variant N-tails, so as to partially complement *CENH3* knock-out mutations. Resulting lines with altered *CENH3*-functionality will be applied as base material for the establishment of a novel haploid technology, which relies on uni-parental genome elimination.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VI
Summary	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XV
1 Einleitung	1
1.1 Plattformen spezifizierbarer Endonukleasen	3
1.1.1 Meganukleasen	3
1.1.2 Zinkfinger-Nukleasen	3
1.1.3 <i>Transcription Activator-Like Effector</i> Nukleasen	4
1.1.4 RNA-vermittelte Endonukleasen	6
1.1.5 DNA-vermittelte Endonukleasen	9
1.2 Zelluläre Reparaturmechanismen für DNA Doppelstrangbrüche	10
1.2.1 Nicht-homologe Endverknüpfung	10
1.2.2 Homologie-abhängige Reparatur	10
1.3 Analyse Zielsequenz-spezifischer Mutationen	11
1.4 Vererbung Zielsequenz-spezifischer Mutationen	12
1.5 <i>N. tabacum</i> und <i>N. benthamiana</i> als experimentelle Modellpflanzen	13
1.6 Das grün fluoreszierende Protein	14
1.7 Das zentromerspezifische Histon 3	15
1.7.1 Funktion und Vorkommen von CENH3	15
1.7.2 Uniparentale Genomeliminierung durch Modifikation von CENH3	16
1.8 Zielstellung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2 Enzyme	19
2.1.3 Antibiotika	19
2.1.4 Oligonukleotide	19
2.1.5 Software	21
2.1.6 Medien und Puffer	21
2.1.6.1 Medien für die Anzucht und Transformation von Bakterien	21
2.1.6.2 Medien für die Anzucht, Transformation und Regeneration von Tabak	21
2.1.6.3 Puffer für die elektrophoretische Auftrennung von DNA	21

2.1.6.4	Puffer für die DNA Gelblot Analyse	22
2.1.6.5	Puffer für die Extraktion von genomischer DNA	22
2.1.7	Verwendete Vektoren	22
2.1.7.1	Transformationsvektor pGH292 (AtUbi10:: <i>gfp</i>)	22
2.1.7.2	<i>Gfp</i> -spezifische TALEN Konstrukte (pSP10 und pSP11)	23
2.1.7.3	Testvektor pTARGET- <i>gfp1</i>	24
2.1.7.4	<i>mCherry</i> Vektor	24
2.1.7.5	CENH3-Komplementationskonstrukte (pSI11 und pSI15)	25
2.1.7.6	<i>NbCENH3</i> -spezifische TALEN Konstrukte (pSI18 und pSI19)	26
2.1.8	Bakterienstämme	26
2.1.9	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	26
2.1.9.1	Anzucht von <i>N. benthamiana</i> und <i>N. tabacum</i> im Gewächshaus	26
2.1.9.2	Sterile Anzucht von <i>N. benthamiana</i> und <i>N. tabacum</i>	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Extraktion genomischer DNA	27
2.2.2	Extraktion von RNA	27
2.2.3	cDNA Synthese	27
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure	28
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	28
2.2.6	DNA Gelelektrophorese	29
2.2.7	Aufreinigung von PCR-Produkten	29
2.2.8	T7E1 Assay	29
2.2.9	TA-Klonierung	29
2.2.10	Blau-Weiß-Selektion	30
2.2.11	Sequenzierung	30
2.2.12	DNA Gelblot Analyse	30
2.2.12.1	Restriktion und Auftrennung genomischer DNA	31
2.2.12.2	Kapillarblot	31
2.2.12.3	Herstellung von DIG-markierten Sonden	32
2.2.12.4	DNA Hybridisierung	32
2.2.12.5	Nachweis spezifischer DNA Sequenzen	32
2.2.13	Enzymatische Restriktion	33
2.2.14	Dephosphorylierung	33
2.2.15	Elution von DNA aus Agarosegel	33
2.2.16	DNA Ligation	33

2.2.17	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	34
2.2.17.1	<i>Escherichia coli</i>	34
2.2.17.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
2.2.18	Kolonie-PCR	34
2.2.19	Extraktion von Plasmid DNA	35
2.2.20	Photometrische Quantifizierung von Bakterienkulturen	35
2.2.21	Transiente Transgenexpression von <i>N. benthamiana</i> und <i>N. tabacum</i> durch Partikelbeschuss	35
2.2.22	Stabile Transgenexpression von <i>N. benthamiana</i> und <i>N. tabacum</i> mittels Agrobakterien	36
2.2.23	Vegetative Erhaltung von Blattexplantaten	36
2.2.24	Embryogene Pollenkultur von <i>N. tabacum</i>	37
2.2.25	Ploidiemessung	37
2.2.26	Colchizinierung haploider Pflanzen	37
2.2.27	Kreuzen von <i>N. benthamiana</i> bzw. <i>N. tabacum</i> Pflanzen	38
2.2.28	Konfokale Mikroskopie	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Etablierung einer TALEN Plattform für <i>N. tabacum</i> unter Verwendung von <i>gfp</i> als Zielgen	40
3.1.1	Herstellung und Charakterisierung einer <i>gfp</i> Reporterlinie von <i>N. tabacum</i>	40
3.1.2	Klonierung <i>gfp</i> -spezifischer TALENs	42
3.1.3	Validierung <i>gfp</i> -spezifischer TALENs mittels transienter Co-Expression mit einem Testvektor	42
3.1.4	Re-Transformation der <i>gfp</i> Reporterlinie mit <i>gfp</i> -spezifischen TALENs	44
3.1.5	Analyse der <i>gfp</i> Zielregion regenerierter Pflanzen	45
3.1.6	Kreuzung von Pflanzen mit je einer der <i>gfp</i> -spezifischen TALEN-Einheiten	45
3.1.7	Analyse der <i>gfp</i> Zielregion in Kreuzungsnachkommen	46
3.1.8	Analyse der Nachkommen von Mutante #X-9	47
3.1.9	Vegetative Erhaltung der TALEN-induzierten <i>gfp</i> Mutation von Pflanze #X-9	48
3.2	Erzeugung von <i>CENH3</i> Mutationen in <i>N. benthamiana</i> mittels TALEN Plattform	49
3.2.1	Partielle Komplementierung von <i>N. benthamiana</i> mit verschiedenen <i>CENH3</i> -Derivaten	49
3.2.1.1	Klonierung der <i>CENH3</i> -Derivate NbH3-tailswap und AtCENH3-tailswap	49
3.2.1.2	Transformation von <i>N. benthamiana</i> mit <i>CENH3</i> -Derivaten	49
3.2.1.3	Lokalisierung der <i>CENH3</i> -Derivate in stabil transgenen Pflanzen	50

3.2.2	Klonierung <i>NbCENH3</i> -spezifischer TALEN Konstrukte	50
3.2.3	Validierung <i>NbCENH3</i> -spezifischer TALENs mittels transienter Co-Expression mit einem Testvektor	52
3.2.4	Transformation von <i>N. benthamiana</i> mit <i>NbCENH3</i> -spezifischen TALENs.....	53
3.2.5	Co-Transformation von <i>N. benthamiana</i> mit Komplementationskonstrukten und <i>NbCENH3</i> -spezifischen TALENs	53
3.2.5.1	Co-Transformation von <i>N. benthamiana</i> mit einem CENH3-Derivat und einer TALEN-Einheit.....	53
3.2.5.2	Co-Transformation von <i>N. benthamiana</i> mit einem CENH3-Derivat und beiden TALEN-Einheiten	54
3.2.6	Analyse der <i>NbCENH3</i> Zielregion in regenerierten Pflanzen	55
3.2.7	Kreuzung verschiedener Pflanzen mit <i>NbCENH3</i> -spezifischen TALENs	55
3.2.8	Analyse der <i>NbCENH3</i> Zielregion in Kreuzungsnachkommen.....	56
3.2.9	Analyse der <i>NbCENH3</i> Zielregion in somatischen Klonen von Kreuzungsnachkommen	56
3.3	Etablierung einer gRNA-vermittelten Cas9 Plattform in <i>N. tabacum</i> unter Verwendung von <i>gfp</i> als Zielgen	57
3.3.1	Klonierung des <i>gfp</i> -spezifischen gRNA/Cas9 Konstrukts	57
3.3.2	Validierung der <i>gfp</i> -spezifischen gRNA/Cas9 mittels transienter Co-Expression mit einem Testvektor	58
3.3.3	Re-Transformation von Reporterpflanzen und Analyse der <i>gfp</i> Zielregion in Regeneraten	58
3.3.4	Analyse der <i>gfp</i> Zielregion in sexuellen Nachkommen primär transgener Pflanzen	60
3.3.4.1	Nachkommenschaftsanalyse von T ₀ Pflanze #125	61
3.3.4.2	Nachkommenschaftsanalyse von T ₀ Pflanze #126	63
3.3.4.3	Nachkommenschaftsanalyse von T ₀ Pflanze #254	64
3.3.4.4	Nachkommenschaftsanalyse von T ₀ Pflanze #258	65
3.3.5	Analyse der <i>gfp</i> Zielregion in regenerierten Pflanzen aus einer embryogenen Pollenkultur der T ₀ Pflanze #125	66
3.3.6	Analyse der T ₂ Generation von Regeneraten aus der embryogenen Pollenkultur	68
3.3.7	Vorkommen von homozygoten Mutanten in der T ₁ von selbstbestäubten T ₀ Pflanzen im Vergleich zu Regeneraten aus der embryogenen Pollenkultur	69
3.3.8	Analyse der <i>gfp</i> Zielregion in somatischen Klonen der T ₀ Pflanze #125	70
3.3.9	Analyse von Nachkommen somatischer Klone der T ₀ Pflanze #125	71
3.3.9.1	Nachkommenschaftsanalyse von Mutante #125-SC01.....	71

3.3.9.2	Nachkommenschaftsanalyse von Mutanten #125-SC02 und #125-SC03	72
3.3.9.3	Nachkommenschaftsanalyse von Mutante #125-SC05.....	72
3.3.10	Vielfalt, Muster und Häufigkeit von gRNA/Cas9-induzierten <i>gfp</i> Mutationen	73
3.3.11	Einfluss von gRNA/Cas9-induzierten <i>gfp</i> Mutationen ohne Veränderung des Leserahmens auf die GFP Fluoreszenz	75
3.4	Erzeugung von <i>NbCENH3</i> Mutationen unter Verwendung der gRNA-vermittelten Cas9 Plattform	77
3.4.1	Klonierung <i>NbCENH3</i> -spezifischer gRNA/Cas9 Konstrukte.....	77
3.4.2	Validierung <i>NbCENH3</i> -spezifischer gRNA-vermittelter Cas9 Endonukleasen mittels transienter Co-Expression mit einem Testvektor	78
3.4.3	Co-Transformation von <i>N. benthamiana</i> mit <i>NbCENH3</i> -spezifischer gRNA/Cas9 Endonuklease und CENH3-Derivaten zur Komplementation.....	79
3.4.4	Analyse der <i>NbCENH3</i> Zielregionen in primär transgenen Pflanzen.....	82
3.4.4.1	Analyse von Regeneraten aus der Co-Transformation mit <i>NbCENH3</i> -gRNA1	82
3.4.4.2	Analyse von Regeneraten aus der Co-Transformation mit <i>NbCENH3</i> -gRNA2	82
3.4.4.3	Analyse von Regeneraten aus der Co-Transformation mit <i>NbCENH3</i> -gRNA3	83
3.4.4.4	Analyse von Regeneraten aus der Transformation mit <i>NbCENH3</i> -gRNA4.....	84
3.4.4.5	Phänotyp von ausgewählten <i>cenh3</i> Mutanten	84
4	Diskussion	86
4.1	Anwendung der TALEN Plattform in zwei <i>Nicotiana</i> Arten.....	86
4.1.1	Vererbbarkeit von TALEN-induzierten <i>gfp</i> Mutationen.....	87
4.1.2	Die Verwendung von <i>NbCENH3</i> -spezifischen TALENs	88
4.2	Anwendung der gRNA-vermittelten Cas9 Endonuklease Plattform in zwei <i>Nicotiana</i> Arten	89
4.2.1	Vererbbarkeit von gRNA/Cas9-induzierten <i>gfp</i> Mutationen	91
4.2.2	Charakteristika gRNA/Cas9-induzierter Mutationen und der Einfluss von Mutationen ohne Leserahmenverschiebung auf die GFP Fluoreszenz.....	94
4.2.3	gRNA/Cas9-induzierte <i>Nbcenh3</i> Mutanten als Haploidie- <i>Inducer</i> -Linien – ein Ausblick...	95
4.3	Transiente Transgenexpression zur Validierung von Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen	97
4.4	Die TALEN und gRNA/Cas9 Plattformen im Vergleich	98
4.5	Genetische Veränderungen in Pflanzen mittels TALENs und gRNA/Cas9 – Vorschläge zur gesetzlichen Regulierung	100
5	Literaturverzeichnis	102

6	Anhang	114
	<i>Danksagung</i>	132
	<i>Lebenslauf</i>	133

Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
% w/v	Massenprozent
% v/v	Volumenprozent
∞	Unendlichzeichen
μ	Mikro
AtCENH3-ts	N-Terminus des nativen CENH3 wurde durch den vom CENH3 aus <i>A. thaliana</i> ausgetauscht (<i>tailswap</i>)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaar(e)
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>)
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein
cDNA	komplementäre DNA
CENH3	zentromerspezifisches Histon 3
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSPD	chemilumineszentes Substrat für alkalische Phosphatasen zur Detektion von Nukleinsäuren
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA Bindedomäne
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSB	DNA Doppelstrangbruch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F ₁	Filialgeneration 1
F ₂	Filialgeneration 2
<i>FokI</i>	TypII Restriktionsenzym aus <i>Flavobacterium okeanoikoites</i>
gDNA	<i>guide</i> DNA
<i>gfp</i> ; GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
gRNA	<i>guide</i> RNA
h	Stunde
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HDR	Homologie-abhängige Reparatur (<i>Homolgy-Directed Repair</i>)
HFD	Histonfaltungsdomäne
inkl.	inklusive
kb	Kilobasenpaare

Abkürzungsverzeichnis

LB	linke Erkennungssequenz der T-DNA (<i>Left Border</i>)
M	Molar
min	Minute
mM	Millimolar
MS	Murashige und Skoog
NAA	1-Naphtylelessigsäure
<i>N. benthamiana</i> ; Nb	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NbH3-ts	N-Terminus des nativen CENH3 wurde durch den vom Histon 3 aus <i>N. benthamiana</i> ausgetauscht (<i>tailswap</i>)
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (<i>Non-Homologous End-Joining</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
nm	Nanometer
<i>N. tabacum</i> ; Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pDNA	Plasmid DNA
RB	rechte Erkennungssequenz der T-DNA (<i>Right Border</i>)
RGEN(s)	RNA-vermittelte Endonuklease(n)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotation per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
S-Tag	15 Aminosäure langes Peptid der RNase A
T ₀	primär Transgene
T ₁	transgene Filialgeneration 1
T ₂	transgene Filialgeneration 2
TALEN(s)	<i>Transcription activator-like effector</i> Nuklease(n)
TALEN-L	linke TALEN-Einheit
TALEN-R	rechte TALEN-Einheit
T-DNA	Transfer DNA
U	Enzymeinheit(en) (<i>Units</i>)
ÜN	über Nacht
V	Volt
WT	Wildtyp
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
<i>yfp</i> ; YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>Yellow Fluorescent Protein</i>)
ZFN(s)	Zinkfinger-Nuklease(n)

1 Einleitung

Die Erzeugung genetischer Variationen von Pflanzen ist sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Pflanzenzüchtung von großer Bedeutung. Schon seit mehreren tausend Jahren werden besonders leistungsfähige Pflanzen miteinander gekreuzt, um die Produktivität und/oder Resistenzen gegenüber Pathogenen oder die Toleranz gegen widrige Bedingungen zu steigern. Zudem wurde die traditionelle Pflanzenzüchtung in den letzten Jahrzehnten mittels Mutagenese von Pflanzen durch Bestrahlung oder mutagene Chemikalien vorangetrieben. Dabei müssen große Mutanten-Populationen untersucht, die Pflanzen mit den erwünschten Merkmalen identifiziert und anschließend durch mehrmaliges Rückkreuzen die Anzahl der Hintergrundmutationen reduziert werden. Ein neuer Meilenstein wurde gesetzt, als erstmals die genetische Transformation von Pflanzen erfolgte. Mit Hilfe des gramnegativen Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* wurde ein aus Hefe stammendes *ALKOHOLDEHYDROGENASE* Gen in Tabakzellen transferiert, stabil transgene Pflanzen regeneriert und die Vererbung der integrierten T-DNA in die nachfolgende Generation nachgewiesen (Barton *et al.* 1983). Durch die Etablierung des Agrobakterien-vermittelten Gentransfers in einer Vielzahl von Arten war und ist es möglich Gene aus unterschiedlichen Organismen in Pflanzenzellen zu transferieren und dadurch gezielter leistungsfähigere Pflanzen zu generieren. Eine andere Methode zur genetischen Transformation von Pflanzen ist die Biolistik, bei der die zu transferierende DNA an Goldpartikel gebunden und mit großem Druck in pflanzliches Gewebe geschossen wird (Sanford *et al.* 1987; Klein *et al.* 1988). Die biolistische Transformation bietet eine Alternative für Pflanzenarten, die sich nicht oder nur mit sehr geringer Effizienz mittels Agrobakterien transformieren lassen. Die neuste methodische Generation der Mutagenese, das *Genome Engineering*, beinhaltet die Verwendung von Zielsequenz-spezifisierten Meganukleasen (Puchta *et al.* 1996), Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs; Kim *et al.* 1996), *Transcription Activator-Like Effector* Nukleasen (TALENs; Christian *et al.* 2010) sowie RNA- oder DNA-vermittelten Endonukleasen (RGENs, NgAgo; Jinek *et al.* 2012; Zetsche *et al.* 2015; Gao *et al.* 2016) (siehe Abb. 1). Diese Endonuklease Plattformen umfassen zum einen ein DNA Bindemodul, das für spezifische Zielsequenzen generiert werden kann. Dieses ist im Falle der Meganukleasen, ZFNs und TALENs proteinös, während die Bindung bei den RGENs und NgAgo auf der Komplementarität von Nucleinsäure-Molekülen beruht. Zum anderen beinhalten diese Plattformen ein enzymatisches DNA Spaltungsmodul – für ZFNs und TALENs ist dies die *FokI*, Cas9 oder Cpf1 für RGENs und ARGONAUTE im Falle der NgAgo Plattform. Die Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen erzeugen DNA Doppelstrangbrüche (DSBs) in oder nahe der Zielsequenz, welche daraufhin durch zelleigene Mechanismen repariert werden. Bei der fehleranfälligeren Nicht-homologen Endverknüpfung (*Non-Homologous End-Joining*, NHEJ) kann es dadurch zu zufälligen Insertionen, Deletionen oder Substitutionen an der Bruchstelle kommen, während die weit präzisere Homologie-abhängige

Reparatur (*Homology-Directed Repair, HDR*), in Kombination mit einer synthetischen Reparaturvorlage, gezielte Insertionen oder Genaustausche generieren kann (Waterworth *et al.* 2011) (Abb. 1).

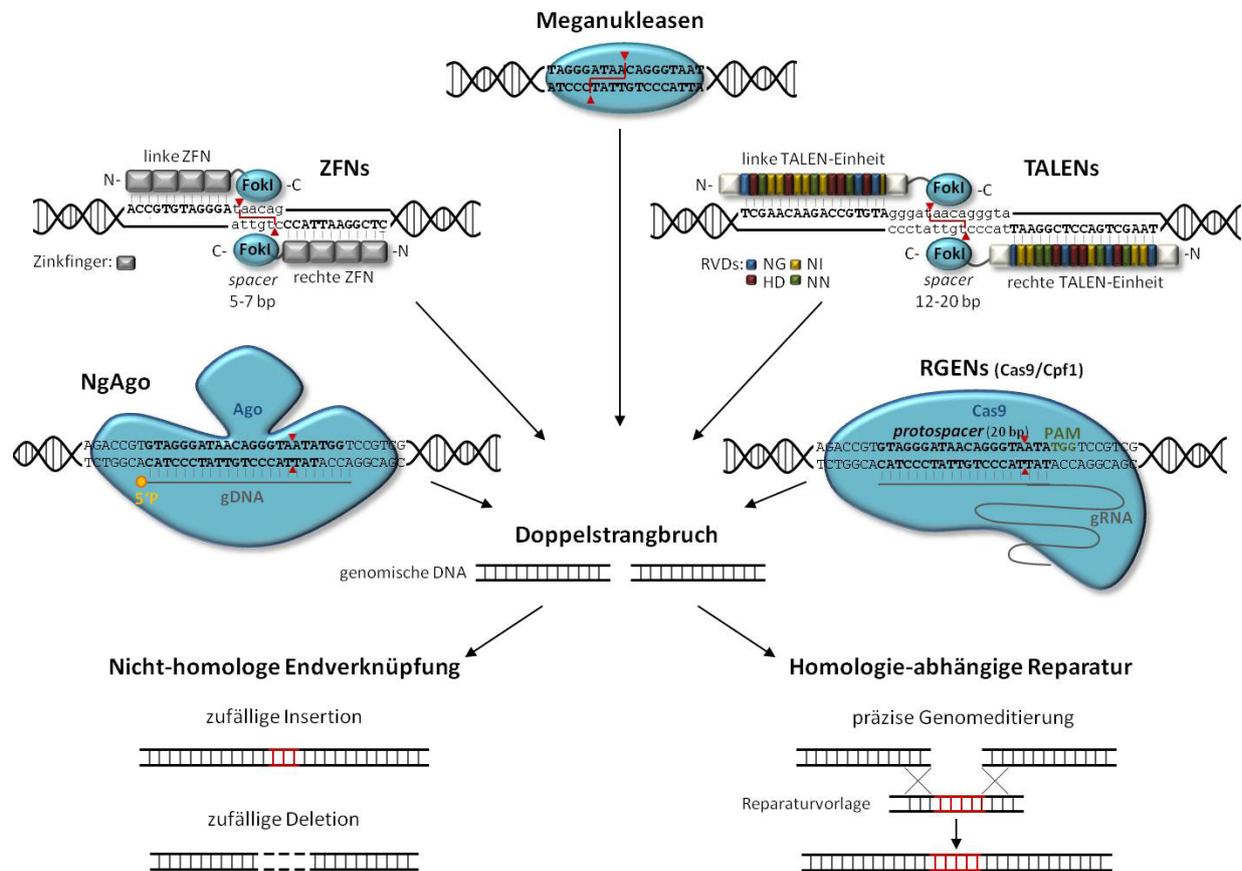


Abb. 1: Die fünf Plattformen Zielsequenz-spezifischer Endonukleasen und mögliche Veränderungen durch zelleigene DNA Doppelstrangbruch Reparaturmechanismen im pflanzlichen Genom (verändert nach Hiekel *et al.* 2015). Die DNA Bindedomänen von Meganukleasen, Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs) und *Transcription activator-like effektor* Nukleasen (TALENs) sind proteinös, während die RNA- und DNA-vermittelten Endonukleasen (RGENs, NgAgo) durch komplementäre Nukleotidpaarungen an die Zielsequenz binden. Die durch die Endonukleasen erzeugten Zielsequenz-spezifischen Doppelstrangbrüche werden anschließend durch die zelleigene Reparaturmaschinerie repariert. Bei der Nicht-homologen Endverknüpfung kann es dabei zu fehlerhafter Reparatur kommen, wodurch zufällige Insertionen oder Deletionen entstehen. Hingegen kann mittels Homologie-abhängiger Reparatur in Kombination mit einer Reparaturvorlage eine Integration, Entfernung, Korrektur oder ein Genaustausch an vordefinierten Stellen im Genom vorgenommen werden. NgAgo: *Neisseria meningitidis* Argonaute, gDNA: *guide* DNA, 5'P: 5'-Phosphatgruppe, RVDs: *Repeat Variable Diresidues*, PAM: *Protospacer-Adjacent Motif*, gRNA: *guide* RNA.

Im Gegensatz zu den Methoden der konventionellen Mutagenese mittels Chemikalien oder Bestrahlung können mit den spezifizierbaren Endonukleasen präzise Modifikationen von genomischen Sequenzen der Wahl herbeigeführt werden. Diese unterscheiden sich weder von den Mutationen die durch konventionelle Mutagenese erzeugt wurden, noch von den in der Natur allgegenwärtigen Veränderungen, die die Evolution vorantreiben. Im Gegensatz zu den gentechnisch veränderten Pflanzen, die z.B. durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer erzeugt wurden, sind die durch Zielsequenz-spezifizierte Endonukleasen induzierten Mutationen nicht zwangsläufig mit der Präsenz eines Transgens assoziiert. Die Endonuklease-codierenden Transgene können z.B. ihre Wirkung aufgrund transientser Expression entfalten (Zhang *et al.* 2016) oder durch einfache

Segregation eliminiert werden. Zudem ist bereits gezeigt worden, dass gRNA und Cas9 auch als vorproduzierte Moleküle in Zellen übertragbar sind und Mutationen der Zielsequenz auslösen können (Woo *et al.* 2015). All diese Prinzipien führen zu genetisch modifizierten, transgenfreien Pflanzen. Das Potential der Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen ist enorm und könnte die Grundlagenforschung und die Pflanzenzüchtung in den nächsten Jahren bedeutend vorantreiben.

1.1 Plattformen spezifizierbarer Endonukleasen

1.1.1 Meganukleasen

Meganukleasen, auch bekannt als *Homing*-Endonukleasen, sind natürlich vorkommende Endonukleasen, die erstmals in Hefe beschrieben wurden. Diese Sequenz-spezifischen Enzyme fördern die Insertion von Introns und Inteinen in ursprünglich Intron/Intein-freie Allele durch die Erzeugung von DSBs und der darauf folgenden Initiierung des sogenannten *Homing* (englisch für Zielfindung) Prozesses (Perrin *et al.* 1993; Belfort & Roberts 1997). Die 14-40 Basenpaar (bp) langen Erkennungssequenzen der Meganukleasen gewährleisten dabei eine hohe Spezifität und eine relativ geringe Toxizität (Chevalier & Stoddard 2001). Meganukleasen selbst werden innerhalb von Intron- und Intein-Sequenzen einer Vielzahl von Eukaryoten codiert.

In Tabak-Protoplasten wurden Zielsequenz-spezifische DSBs durch die Meganuklease I-SceI aus *Saccharomyces cerevisiae* erzeugt, was dazu führte, dass das co-transformierte Reparaturkonstrukt mit einer stark erhöhten Frequenz durch HDR integriert wurde (Puchta *et al.* 1996). Ein ähnlicher Ansatz wurde mit dem Enzym I-CeuI demonstriert, was zu vergleichbaren Ergebnissen führte (Chilton & Que 2003). Auch in der monokotyledonen Nutzpflanze Mais konnte gezeigt werden, dass durch gezielte DSB-induzierte HDR an einer I-SceI Stelle präzises *Engineering* möglich ist (D'Halluin *et al.* 2008). Die Verwendung von Meganukleasen zur Steigerung von *Gene Targeting* wird durch eine geringe Anzahl zum einen an möglichen Erkennungssequenzen innerhalb eines Genoms und zum anderen von verfügbaren Meganukleasen limitiert. Das modifizierte Meganukleasen erfolgreich Zielsequenz-spezifische Mutationen erzeugen können, wurde in Mais demonstriert (Gao *et al.* 2010). Da die DNA Bindedomäne (DBD) von Meganukleasen nicht von der katalytischen Domäne getrennt ist, ist die weitere Spezifizierung dieser Endonukleasen auf andere Zielsequenzen allerdings sehr komplex, aufwändig und limitiert (Prieto *et al.* 2007).

1.1.2 Zinkfinger-Nukleasen

Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs) sind Fusionsproteine, bestehend aus mehreren Zinkfingern, die die DBD bilden, und der katalytischen Domäne der *FokI* Nuklease (siehe Abb. 1). *FokI* wurde aus *Flavobacterium okeanoicoites* isoliert und ist ein Typ IIS Restriktionsenzym, welches eine spezifische DNA Sequenz erkennt, aber unspezifisch wenige Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt, schneidet (Sugisaki & Kanazawa 1981). Es besteht aus einer N-terminalen Domäne, die die DNA

erkennt und einer C-terminalen Restriktionsdomäne (Li *et al.* 1992). Zur Erzeugung von DSBs muss die katalytische Domäne der *FokI* dimerisieren (Bitinaite *et al.* 1998; Wah *et al.* 1998); aus diesem Grund müssen Zinkfinger-Nukleasen als Paar agieren und entsprechend designt werden. Zinkfinger sind sich wiederholende Motive innerhalb eines Proteins, die Zink beinhalten und nach der DNA „greifen“, welche erstmals in dem Transkriptionsfaktor IIIA entdeckt wurden (Miller *et al.* 1985). Miller und Kollegen (1985) postulierten außerdem, dass ein Motiv des Transkriptionsfaktor IIIA Proteins aus 30 Aminosäuren besteht, wovon sich 25 um das Zinkion falten und so ein kleines unabhängiges Modul bilden, was als Finger bezeichnet wird. Die restlichen fünf Aminosäuren fungieren als Linker zwischen aufeinander folgenden Fingern, was durch spätere Arbeiten bestätigt wurde (zusammengefasst in Klug 2010). Die Modularität von Zinkfinger-Proteinen sowie der *FokI* führten dazu, dass Fusionsproteine – Zinkfinger-Nukleasen – hergestellt wurden, die erfolgreich eine λ DNA Zielsequenz-spezifisch geschnitten haben (Kim *et al.* 1996). Dabei erkennt ein Zinkfinger drei Nukleotide und drei bis vier Zinkfinger bilden die DBD einer ZFN-Einheit. Da die ZFNs als Paar fungieren, beläuft sich die gesamte Erkennungssequenz auf 18-24 bp.

Es dauerte einige Jahre bevor auch bei Pflanzen demonstriert wurde, dass mittels ZFNs Mutationen an spezifischen Sequenzen des Genoms erzeugt werden können. Zum einen wurden in *Arabidopsis*-Pflanzen ZFNs exprimiert, die DSBs induzierten, welche durch NHEJ repariert wurden und dadurch Indels erzeugten (Lloyd *et al.* 2005). Zum anderen konnte in Tabak-Protoplasten durch den Einsatz von ZFNs und einer Reparaturvorlage erfolgreich die *Gene Targeting* Frequenz erhöht werden (Wright *et al.* 2005). Es folgten weitere Beispiele für *Arabidopsis* (Tovkach *et al.* 2009; Osakabe *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2010; de Pater *et al.* 2013), Tabak (Maeder *et al.* 2008; Cai *et al.* 2009; Townsend *et al.* 2009; Marton *et al.* 2010), Mais (Shukla *et al.* 2009) und Petunie (Marton *et al.* 2010), die sowohl Zielsequenz-spezifische Mutationen nach ZFN-induzierten DSBs mittels NHEJ als auch die gezielte Integration von Reparatur-DNA durch HDR zeigten.

In humanen Zellen führte eine lange und/oder starke Expression von ZFNs zu zytotoxischen Seiteneffekten, die eventuell aufgrund von induzierten Mutationen an sogenannten *Off-Targets* zu erklären sind (Porteus & Baltimore 2003; Alwin *et al.* 2005). *In vitro* Experimente zeigten, dass die Induktion von DSBs auch über eine schwache Protein-Protein-Interaktion zwischen einem *FokI* Monomer, welches an die Zielsequenz gebunden ist, und einem zweiten ungebundenen Monomer möglich ist (Catto *et al.* 2006). Es wird daher angenommen, dass bei hohen Konzentrationen von ZFNs ebenfalls ein homodimerer Komplex entstehen kann, der befähigt ist die Induktion von DSBs an *Off-Targets* und somit Toxizität zu verursachen (Szczepiek *et al.* 2007).

1.1.3 **Transcription Activator-Like Effector Nukleasen**

Transcription Activator-Like Effector (TALE) Proteine sind eine große Proteinfamilie, die von vielen Arten der Gattung *Xanthomonas* gebildet werden. Diese phytopathogenen Bakterien verursachen

verschiedene Krankheiten bei vielen Kulturpflanzen, wie z.B. die Aderschwärze bei Kohlarten, die Weißblättrigkeit bei Reis oder die Streifenkrankheit bei Getreiden. *Xanthomonas* transloziert über das Typ III Sekretionssystem einen Cocktail aus Effektorproteinen in die Pflanzenzelle, welche anschließend in den Zellkern eindringen und dort an spezifische DNA Sequenzen binden (Bogdanove *et al.* 2010). Als Folge wird die Expression von Zielgenen aktiviert, um den Abwehrmechanismus der Pflanze zu unterdrücken und die bakterielle Virulenz zu fördern. Das Typ III Sekretionssignal ist im N-Terminus der TALE Proteine lokalisiert, während sich im C-Terminus ein Kernlokalisierungssignal und eine Aktivierungsdomäne befinden. Mit der Entschlüsselung der Spezifität der DNA Bindung der TALE Proteine (Boch *et al.* 2009; Moscou & Bogdanove 2009) war die Grundlage für eine weitere Plattform synthetischer Endonukleasen geschaffen. Genauso wie die ZFNs sind die *Transcription Activator-Like Effector* Nukleasen (TALENs) Fusionsproteine, bestehend aus einer DBD, basierend auf denen der TALE Proteine, und der katalytischen Domäne der *FokI* Endonuklease (Christian *et al.* 2010). Die DBD besteht aus mehreren Sequenzwiederholungen, welche miteinander assemblieren und sich als Superhelix um die DNA wickeln. Die nahezu identischen Wiederholungen bestehen jeweils aus 33-35 Aminosäuren mit Polymorphismen, die hauptsächlich an den Aminosäurepositionen 12 und 13 auftreten und als *Repeat Variable Di-residue* (RVD) bezeichnet werden (Moscou & Bogdanove 2009) (siehe Abb. 2). Diese RVDs sind für die Spezifität zur Zielsequenz verantwortlich, wobei eine RVD an ein Nukleotid bindet. Die vier am häufigsten vorkommenden RVDs sind HD (Histidin, Asparaginsäure), NG (Asparagin, Glycin), NI (Asparagin, Isoleucin) und NN (Asparagin, Asparagin) welche starke Assoziationen mit Cytosin, Thymin, Adenin bzw. Guanin und Adenin haben (Boch *et al.* 2009; Moscou & Bogdanove 2009). Um den Basen-spezifischen Kontakt zwischen RVDs und DNA herzustellen, bildet jede Wiederholung eine kurze und eine lange α -Helix, welche durch einen *Loop* miteinander verbunden sind und so die RVD zur DNA hin präsentieren (Deng *et al.* 2012; Mak *et al.* 2012). Die Anzahl der Wiederholungen der DBD kann variieren, wobei üblicherweise 14-18 pro TALEN-Einheit verwendet werden. Da die TALENs, wie die ZFNs auch, als Paar designt werden müssen, damit die *FokI* Monomere dimerisieren und einen DSB erzeugen können, beträgt die gesamte Erkennungssequenz 28-36 bp (Hiekel *et al.* 2015). Die beiden Einheiten, die in inverser Orientierung an die DNA binden, werden durch eine Distanz der DNA Ziel motive von 12-20 bp (dem sogenannten *Spacer*) voneinander getrennt. Studien haben gezeigt, dass die DBD ohne N- und C-Termini des verwendeten TAL-Effektors (üblicherweise AvrBs3 von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) im Kontext der Fusion mit *FokI* nicht effizient funktioniert (Kay *et al.* 2007; Christian *et al.* 2010), weshalb verschiedene Verkürzungen der AvrBs3-Termini getestet wurden, um eine hohe Aktivität zu gewährleisten, aber die Proteingröße zu reduzieren. TALENs mit verkürztem C-Terminus induzierten in humanen Zellen effizient Mutationen, wobei die Kombination von einem 63 Aminosäuren langen C-Terminus mit einer 14-18 bp langen *Spacer* Region die besten Ergebnisse erzielte (Miller *et al.*

2011). In der gleichen Studie wurde zudem ein 152 Aminosäuren langer N-Terminus verwendet, während von Mussolino *et al.* (2011) neben Verkürzungen des C-Terminus auch zwei Varianten des N-Terminus getestet wurden. Dabei stellte sich heraus, dass ein N-Terminus mit einer Länge von 153 Aminosäuren eine effiziente Bindung der TALENs zur Zielsequenz gewährleistet, während dies mit einem 49 Aminosäure langen N-Terminus nicht möglich war.

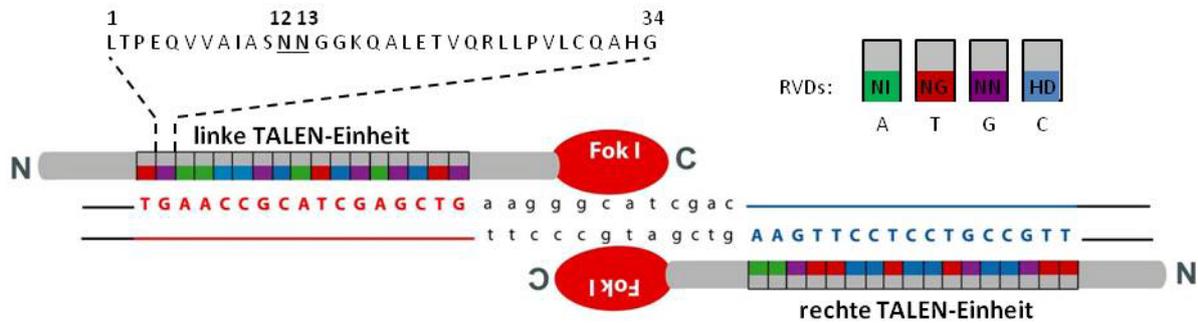


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Transcription Activator-Like Effector Nukleasen (TALENs; verändert nach Gurushidze *et al.* 2014). Die DNA Bindedomäne einer TALEN-Einheit besteht aus mehreren Sequenzwiederholungen, die wiederum aus 33-35 Aminosäuren bestehen. Die nahezu identischen Wiederholungen unterscheiden sich in den Positionen 12 und 13, welche als *Repeat Variable Di-residue* (RVD) bezeichnet werden und für die spezifische Bindung an die Zielsequenz verantwortlich sind. Rechts oben sind die vier am häufigsten verwendeten RVDs mit ihren präferierten Nucleotiden im Einbuchstabencode dargestellt. Die rote Nucleotidsequenz repräsentiert die Zielsequenz der linken und die blaue die der rechten TALEN-Einheit. Die Kleinbuchstaben zeigen die Region wo die *FokI* Monomere dimerisieren und einen DNA Doppelstrangbruch erzeugen.

Erste Erfolge bei der Induktion von Mutationen in Pflanzen wurden in *Arabidopsis*-Protoplasten (Cermak *et al.* 2011) und Blättern von *N. benthamiana* (Mahfouz *et al.* 2011) erreicht. Kurz darauf erschien eine Arbeit, in der Reispflanzen mit TALEN-induzierten Mutationen erzeugt und die Vererbung dieser Mutationen nachgewiesen wurde (Li *et al.* 2012). In den folgenden Jahren stieg die Anzahl der Pflanzenarten, bei denen mittels TALENs Veränderungen im Genom vorgenommen wurden, darunter befanden sich auch Kulturpflanzen wie z.B. Sojabohne (Haun *et al.* 2014), Tomate (Lor *et al.* 2014), Gerste (Gurushidze *et al.* 2014), Weizen (Wang *et al.* 2014) und Mais (Char *et al.* 2015). Neben diesen NHEJ-vermittelten Mutationen wurde ebenfalls demonstriert, dass TALEN-induzierte DSBs, unter der Voraussetzung, dass eine Reparaturvorlage vorhanden ist, den HDR-vermittelten Genaustausch bzw. eine gezielte Insertion von Genen in Pflanzen positiv beeinflussen (Zhang *et al.* 2013; Budhagatapalli *et al.* 2015). Durch die Modularität der DBD der TALE Proteine ist es möglich, dass neben Endonukleasen auch funktionale Domänen von anderen Enzymen wie Methylasen, Aktivatoren oder Repressoren der Transkription an den C-Terminus fusioniert werden können, um die Genexpression in Pflanzen zu modifizieren (Fichtner *et al.* 2014).

1.1.4 RNA-vermittelte Endonukleasen

Im Jahr 2012 wurde eine neue Plattform Zielsequenz-spezifischer Endonukleasen präsentiert, welche auf einem bakteriellen RNA-vermittelten Abwehrmechanismus basiert (Jinek *et al.* 2012). Bakterien und Archaea haben dieses anpassungsfähige Abwehrsystem entwickelt, welches *Clustered*

Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) genannt wird, um sich vor eindringenden Viren und Plasmiden zu schützen (Wiedenheft *et al.* 2012). Die CRISPR/Cas-vermittelte Abwehr erfolgt in drei Schritten: (1) Zunächst werden in einer adaptiven Phase kurze Fragmente von Fremd-DNA (*Protospacer*) in das eigene Chromosom am proximalen Ende des CRISPR Arrays eingebaut. (2) Danach erfolgt die Expressions- und Interferenzphase, während der *Repeat-Spacer* Elemente in eine *precursor* CRISPR RNA (pre-crRNA) transkribiert werden und durch nachfolgende enzymatische Spaltung in der aktiven Form der CRISPR RNAs (crRNA) resultieren. Diese crRNAs erkennen komplementäre *Protospacer* Sequenzen von eingedrungenen Viren oder Plasmiden. (3) Die Erkennung der Zielsequenz durch die crRNAs führt zum Abbau der Fremd-DNA durch die Cas Proteine, die in einem Komplex unter Beteiligung der crRNA fungieren (Jinek *et al.* 2012).

Die CRISPR/Cas Systeme werden in drei Typen klassifiziert, die wiederum in mehrere Untergruppen und chimäre Varianten unterteilt werden (Makarova *et al.* 2011). Die RNA-vermittelten Endonukleasen, die für das *Genome Engineering* verwendet werden, basieren vorwiegend auf dem Typ II CRISPR/Cas System aus *Streptococcus pyogenes*. Dieses System unterscheidet sich von Typ I und III dahingehend, dass die pre-crRNA durch einen anderen Mechanismus prozessiert wird. Dabei erkennt und bindet eine *trans*-codierte RNA (tracrRNA) die *Repeat*-Sequenzen der pre-crRNA, was in der Bildung eines RNA-Duplex resultiert. Dieser wird von der RNase III erkannt und in Gegenwart des Cas9 Proteins in kleine Stücke geschnitten. Diese Einheiten werden weiter prozessiert, was letztendlich in der aktiven Form der crRNAs resultiert (Deltcheva *et al.* 2011). Es wurde gezeigt, dass eine aktive crRNA in Gegenwart von tracrRNA und Cas9 Protein in der Lage ist Plasmid DNA (pDNA), Zielsequenz-spezifisch zu schneiden; Grundlage für die Reaktion war eine crRNA mit komplementärer Sequenz zur Ziel-DNA (Jinek *et al.* 2012). In derselben Publikation wurden die crRNA und tracrRNA in einer einfachen chimären RNA (*guide* RNA; gRNA) zusammengefasst, wobei das 3'-Ende der crRNA mit dem 5'-Ende der tracrRNA fusioniert wurde, um die duale RNA Struktur zu imitieren, welche für das Zielsequenz-spezifische Schneiden mittels Cas9 gebraucht wird (siehe Abb. 3). Spaltungsversuche mit pDNA unter Verwendung der chimären RNA waren erfolgreich und ließen den Schluss zu, dass dieses System das Potential für RNA-programmierbares *Genome Engineering* hat (Jinek *et al.* 2012). Der DSB wird durch die beiden Nukleasedomänen der Cas9, die HNH und die RuvC Domäne, erzeugt, die den komplementären bzw. nicht-komplementären Strang schneiden (Jinek *et al.* 2012).

Im Prinzip kann jede DNA Sequenz von Interesse angesteuert werden, vorausgesetzt dass ein GG Di-Nukleotid, der spezifische Teil des *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM), nach einem beliebigen Nukleotid auf die *Protospacer*-Sequenz in 3'-Richtung folgt. Die gesamte Zielsequenz besteht also aus *Protospacer* und PAM und umfasst 23 bp (Abb. 3). Der DSB erfolgt zwischen dem dritten und vierten

Nukleotid in 5'-Richtung von dem PAM und führt, im Gegensatz zur *FokI*, zu Enden ohne Überhang. Vor Kurzem wurde eine weitere RNA-vermittelte Endonuklease (RGEN) und deren Fähigkeit, effizient genomische Veränderungen in humanen Zellen zu erzeugen, demonstriert (Zetsche *et al.* 2015). Diese RGEN besteht aus der crRNA, die tracrRNA fehlt, und der Cpf1 Endonuklease. Im Gegensatz zur Cas9 erkennt die Cpf1 das PAM NTT, das sich am 5'-Ende des *Protospacers* befindet und erzeugt DSBs mit überhängenden Enden. Durch das T-abhängige PAM der Cpf1 erweitert sich die Bandbreite an möglichen Zielsequenzen von RGENs (Zetsche *et al.* 2015).

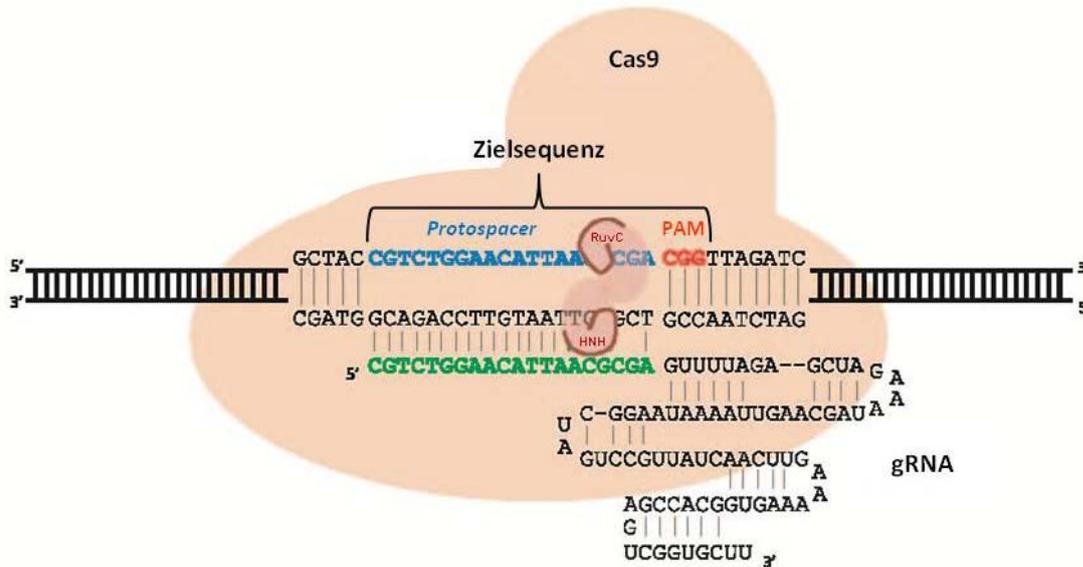


Abb. 3: Schematischer Aufbau der gRNA-vermittelten Cas9 in Verbindung mit der Zielsequenz (verändert nach Mahfouz *et al.* 2014). Die Cas9 Endonuklease wird durch eine chimäre *guide RNA* (gRNA) zur Zielsequenz geleitet, wo sie spezifische Doppelstrangbrüche erzeugt. Diese Zielsequenz besteht zum einen aus dem *Protospacer*, eine 20 bp lange Sequenz, an die die gRNA durch komplementäre Basenpaarungen bindet. Zum anderen wird die Zielsequenz durch das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM) definiert, welches aus NGG Nukleotiden besteht, die sich am 3'-Ende des *Protospacers* befinden. Das PAM ist eine Voraussetzung für die Bindung und das Schneiden der DNA, was durch die beiden katalytischen Domänen der Cas9 vermittelt wird. Die RuvC schneidet dabei den nicht-komplementären Strang der DNA und die HNH den komplementären.

Dank der einfachen Generierung von Zielsequenz-spezifisierten gRNAs, wurde die Plattform der RNA-vermittelten Endonukleasen sehr schnell etabliert und die Funktionalität bereits in einer Vielzahl von Organismen demonstriert. Neben der Anwendung in humanen Zelllinien (Cho *et al.* 2013; Jinek *et al.* 2013), Mäusezellen (Cong *et al.* 2013; Shen *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013), Zebrafischembryos (Chang *et al.* 2013; Hwang *et al.* 2013) und *Drosophila* (Gratz *et al.* 2013) wurden Erfolge auch in mono- und dikotylen Pflanzen gezeigt. Zunächst wurden auf Zellebene Mutationen in verschiedenen Genen von *Arabidopsis* und *N. benthamiana* (Li *et al.* 2013; Nekrasov *et al.* 2013) induziert. Später folgten Beispiele in Reis (Feng *et al.* 2013; Shan *et al.* 2013), *Arabidopsis* (Feng *et al.* 2013), Weizen (Wang *et al.* 2014), Tomate (Brooks *et al.* 2014), *N. tabacum* (Gao *et al.* 2015), Pappel (Fan *et al.* 2015) Raps und Gerste (Lawrenson *et al.* 2015), in denen Pflanzen mit induzierten Mutationen regeneriert wurden. Die Anzahl an Pflanzenarten, die durch RNA-vermittelte Endonukleasen mutiert werden, steigt beständig weiter an, wobei ein Großteil der induzierten Mutationen durch den

fehlerbehafteten NHEJ DSB-Reparaturmechanismus entsteht. Währenddessen ist das gezielte Einsetzen oder der Austausch von Genen mittels HDR erst in wenigen Situationen gezeigt worden, mit Beispielen in den Modellpflanzen *Arabidopsis* (Schiml *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2016) und *N. benthamiana* (Li *et al.* 2013), aber auch in Nutzpflanzen wie Sojabohne (Li *et al.* 2015) und Reis (Sun *et al.* 2016). Durch eine Punktmutation in einer der beiden Nukleasedomänen der Cas9 kann diese nicht nur als Nuklease sondern auch als Nickase fungieren (Jinek *et al.* 2012). Untersuchungen in *Arabidopsis* haben gezeigt, dass durch die Verwendung von zwei gRNA/Cas9 Nickasen Mutationen erzeugt werden können (Schiml *et al.* 2014). Gepaarte Nickasen erhöhen somit die Länge der Zielsequenz, wodurch *Off-Target* Effekte vermieden werden könnten.

Die meisten gRNA/Cas9-induzierten Mutationsereignisse verursachen eine Verschiebung des Leserahmens und somit einen Verlust der Funktionalität des Gens (Ma *et al.* 2016). Werden zwei Zielsequenzen gleichzeitig angesteuert, ist es außerdem möglich die Deletion von großen Fragmenten (Li *et al.* 2013; Mao *et al.* 2013) bis hin zu ganzen Genen und chromosomalen Regionen zu induzieren (Zhou *et al.* 2014). Des Weiteren sind einige Beispiele aus *Arabidopsis* bekannt, in denen mehrere Gene gleichzeitig mutiert wurden (*Multiplexing*; Li *et al.* 2013; Mao *et al.* 2013; Xing *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015; Yan *et al.* 2016).

1.1.5 DNA-vermittelte Endonukleasen

Die neuste Plattform des *Genome Engineerings* ist eine DNA-vermittelte Endonuklease aus *Natronobacterium gregoryi* (Gao *et al.* 2016). Dieses sogenannte Argonautenprotein spielt, ähnlich wie die Cas9, eine Rolle bei der Abwehr von Fremd-DNA, wobei 5'-phosphorylierte kurze, einzelsträngige Nukleinsäuren (13-25 bp) die Endonuklease zur Zielsequenz leiten (Swarts *et al.* 2014). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde ein NgAgo-gDNA (für *N. gregoryi* Argonaute-guide DNA) System entwickelt (siehe Abb. 1) und in humanen Zellen getestet. Mit diesem System konnten Mutationen in Endogenen induziert werden, wobei Deletionen und Insertionen auftraten (Gao *et al.* 2016). In derselben Arbeit wurde außerdem experimentell demonstriert, dass die NgAgo-gDNA GC-reiche DNA Abschnitte effizienter mutiert als die RNA-vermittelte Cas9 und eine geringe Toleranz gegenüber Fehlpaarungen hat. Es ist bisher nichts darüber bekannt, dass spezifische Sequenzen, wie das PAM bei der Cas9, bei der Auswahl der Zielsequenzen beachtet werden müssen (Gao *et al.* 2016). Bis jetzt gibt es keine weiteren Publikationen, die die Anwendung des NgAgo-gDNA Systems in anderen Organismen demonstrieren. Ein kritischer Punkt dieses Systems könnte, insbesondere im Hinblick auf die Anwendung in Pflanzen, die Temperatur von 37 °C sein, bei der die Argonautenproteine arbeiten.

1.2 Zelluläre Reparaturmechanismen für DNA Doppelstrangbrüche

1.2.1 Nicht-homologe Endverknüpfung

Untersuchungen zur Reparatur von DSBs sowie Analysen zum Einbau von Transgenen in Pflanzengenome haben gezeigt, dass die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) für die Reparatur präferentiell verwendet wird (Waterworth *et al.* 2011). Bisher sind zwei Mechanismen der NHEJ bekannt, die in Pflanzen agieren: die kanonische oder klassische NHEJ (*classical* NHEJ (cNHEJ)) und eine alternative NHEJ (aNHEJ). Beim cNHEJ Mechanismus wird durch die Ligation der DNA Enden meist die originale Sequenz erhalten, aber der Verlust von genetischer Information oder die Insertion von sogenannten Mikrohomologien an der neuen Verbindung können auch vorkommen (Puchta & Fauser 2014). Im Vergleich dazu kommt es bei dem aNHEJ Mechanismus zur Resektion der DNA Enden mit anschließender Paarung von komplementären Nukleotiden und der Re-Ligation der Enden (Puchta & Fauser 2014). Als Folge dessen entstehen größere Deletionen, wodurch vergleichsweise viel genetische Information verloren geht. Die beiden NHEJ Mechanismen scheinen um DSBs zu konkurrieren (Puchta & Fauser 2014), wobei diese einer Hierarchie unterliegen und der cNHEJ Mechanismus in Pflanzen Vorrang hat (Waterworth *et al.* 2011).

Als Folge der fehlerhaften Reparatur durch die NHEJ entstehen Insertionen und/oder Deletionen an der Bruchstelle, die erwartungsgemäß in zwei Dritteln der Fälle zu einer Verschiebung des translationalen Leserahmens führen. Neben der daraus resultierenden Nonsensesequenz entstehen auch mit hoher Wahrscheinlichkeit frühzeitige Stopcodons. Die DSBs, die durch Zielsequenz-spezifizierte Endonukleasen erzeugt werden, führen deshalb vorrangig zum funktionellen Knock-out des Gens.

1.2.2 Homologie-abhängige Reparatur

Während in Hefe und Bakterien die Homologie-abhängige Reparatur (HDR) der dominierende Mechanismus ist um DSBs zu reparieren, spielt dieser in somatischen Pflanzenzellen eine untergeordnete Rolle. Hauptsächlich tritt die HDR während der S und G2 Phase des Zellzykluses auf, wobei homologe Sequenzen, wie z.B. die des Schwesterchromatids, als Vorlage für die Reparatur verwendet werden. Die zwei bekanntesten Mechanismen der HDR in somatischen Zellen sind zum einen das Einzelstrang-Annealing (*Single Strand Annealing*, SSA) und zum anderen das Synthese-abhängige Strang-Annealing (*Synthesis Dependent Strand Annealing*, SDSA; Puchta & Fauser 2014). Bei beiden Mechanismen werden zunächst die losen DNA Enden reseziert, sodass 3'-Überhänge entstehen. Bei dem SSA Mechanismus hybridisieren anschließend diese Einzelstränge mit komplementären Regionen, wobei nicht-homologe Überhänge verdaut und Lücken durch die Reparatursynthese gefüllt werden (Siebert & Puchta 2002). Der SSA Mechanismus arbeitet nur, wenn DSBs zwischen zwei homologen Sequenzen auftreten und führt aufgrund der Deletionen zum Verlust

von Sequenzinformation (Puchta & Fauser 2014). Im Vergleich dazu erfolgt bei der Reparatur von DSBs durch das SDSA kein Verlust von Sequenzen, aber es kann zu Veränderungen des Informationsinhalts kommen. Bei diesem Mechanismus bildet eins der erzeugten 3'-Enden eine D-Loop-Struktur mit der homologen, doppelsträngigen Reparaturvorlage. Nach der Elongation wird dieser Strang freigegeben und hybridisiert mit dem 3'-homologen Strang, um letztendlich den Bruch aufzufüllen (Puchta & Fauser 2014).

Während in Hefe die DNA Integration für DSB-unabhängiges *Gene Targeting* durch HDR sehr effizient ist, sind derartige *Gene Targeting* Frequenzen in Pflanzen artabhängig (de Pater *et al.* 2013). So wurde gezeigt, dass in niederen Pflanzen, wie z.B. dem Moos *Physcomitrella patens*, die Integration von Fremd-DNA hauptsächlich durch HDR erfolgt, wenn diese 50-200 bp lange homologe Sequenzen aufweist (Schaefer 2002). Im Gegensatz dazu wird die DNA Integration in höheren Pflanzen durch NHEJ vermittelt, die Häufigkeit von *Gene Targeting* Ereignissen kann aber durch induzierte DSBs gesteigert werden. Dies wurde erstmals in Tabak durch die Verwendung einer Meganuklease (siehe Kapitel 1.1.1) gezeigt, wodurch die *Gene Targeting* Frequenz um zwei Größenordnungen zunahm (Puchta *et al.* 1996).

1.3 Analyse Zielsequenz-spezifischer Mutationen

Induzierte Mutationen an der Zielsequenz von spezifizierten Endonukleasen führen oftmals zu Veränderungen dieser Erkennungssequenz durch Insertionen und/oder Deletionen, als Folge des zelleigenen NHEJ Reparaturmechanismus. Eine Vielzahl an molekularen Methoden ist verfügbar, um diese genetischen Modifikationen zu detektieren, darunter z.B. ein auf Restriktionsenzymen basierender Assay. Dabei wird die Zielsequenz so ausgesucht, dass sich eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym darin befindet, die bei erfolgreicher Mutagenese zerstört wird. Bei dem nachfolgenden Restriktionsverdau von PCR Amplifikaten der Zielregion werden mutierte Allele und Wildtyp (WT) Allele unterschiedlich verdaut, was letztendlich bei der Gelelektrophorese sichtbar wird (Lloyd *et al.* 2005). Bei den Surveyor (Oleykowski *et al.* 1998; Qiu *et al.* 2004) und T7 Endonuklease 1 Assays (T7E1; Mashal *et al.* 1995) erkennen und schneiden die verwendeten Nukleasen sogenannte Heteroduplex DNA. Diese DNA Fragmente entstehen, wenn im PCR Amplifikat der Zielregion WT und mutierte Sequenzen hybridisieren. Auch bei diesen Tests erfolgt die Auswertung mittels Gelelektrophorese. Der Surveyor/T7E1 Assay ist für jede Zielsequenz anwendbar, Mutationen werden aber erst bei einer Frequenz von ~1 % oder mehr detektiert, wodurch Mutationen die in geringeren Mengen vorliegen unentdeckt bleiben (Voytas 2013). Im Vergleich dazu ist der auf Sequenz-spezifischen Restriktionsenzymen basierende Assay sensitiver, schränkt aber die Auswahl der Zielsequenzen ein, da eine passende Schnittstelle vorhanden sein muss. Eine weitere Möglichkeit zur Detektion von induzierten Mutationen ist das *High-Resolution Melting* (Wittwer *et al.* 2003), bei dem die Sensitivität aber auch relativ gering ist (zusammengefasst in Ma *et al.* 2016). Sollen

Mutationen charakterisiert werden, wird die Hochdurchsatz-Sequenzierung oder die Sanger-Sequenzierung verwendet, welche zeitaufwändig und kostenintensiv sind. Mit beiden Methoden ist es möglich komplizierte chimäre Mutationen zu identifizieren (Ma *et al.* 2016).

1.4 Vererbung Zielsequenz-spezifischer Mutationen

Die Vererbung von Mutationen, die durch Zielsequenz-spezifizierte Endonukleasen induziert wurden, erfolgt unabhängig von dem integrierten Transgen. Durch einfache Segregation ist es möglich die Konstrukte von der erwünschten Modifikation zu eliminieren, wie es für die TALEN (Wang *et al.* 2014; Char *et al.* 2015) und RNA-vermittelte Cas9 Technologie (Zhou *et al.* 2014; Xu *et al.* 2015) gezeigt wurde. Sowohl der Zeitpunkt als auch die Zellschicht, in der die Mutationen induziert werden, spielen für die nachfolgende Vererbung eine wichtige Rolle. Mutationen die in der frühen Entwicklung von L2 Zellen des Apikalmeristems erzeugt wurden, werden mit großer Wahrscheinlichkeit in die nächste Generation übertragen (Irish & Jenik 2001). Im Gegensatz dazu werden Mutationen, die während der späteren Entwicklung oder in Zellschichten die nicht an der Bildung der Gametophyten beteiligt sind, induziert wurden, nicht vererbt. Besonders bei chimären Pflanzen (jene mit mindestens drei Allelen des betreffenden Gens, inklusive des WT) handelt es sich oft um solche somatischen Mutationen, weshalb nicht alle dieser Modifikationen in der nächsten Generation wieder detektiert werden können und das Segregationsmuster nicht den Mendelschen Vorhersagen entspricht (Feng *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014). Neben den in der Mutterpflanze detektierten Mutationen können neue Modifikationen in der nächsten Generation auftreten, solange eine intakte Zielsequenz vorhanden ist (Gurushidze *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014; Hyun *et al.* 2015; Xu *et al.* 2015). Putativ homozygote Mutationen hingegen können durch die Vererbung in die nächste Generation bestätigt werden; wie z.B. in *Arabidopsis* demonstriert, wurden homozygote Mutationen stabil über zwei Generationen vererbt, in Gegenwart oder Abwesenheit der RNA-vermittelten Cas9 (Feng *et al.* 2014). Eine Ausnahme dabei spielen kleine Indels, die durch ZFNs oder TALENs induziert wurden, aber nicht zur Veränderung der Erkennungssequenzen führten. Wie in Gerste gezeigt, konnte eine maternale 4 bp Deletion in der *Spacer* Region nicht unter den Nachkommen wiedergefunden werden (Gurushidze *et al.* 2014).

Die Vererbung von TALEN-induzierten Mutationen wurde bisher nur in *N. benthamiana* untersucht, wohingegen in *N. tabacum* lediglich transiente Experimente durchgeführt wurden. Die Co-Transformation von zwei spezifischen TALEN-Paaren führte in 3 % der untersuchten regenerierten *N. benthamiana* Pflanzen zu Mutationen an allen Allelen von allen vier Zielgenen (Li *et al.* 2016). Die Nachkommen einer dieser Pflanzen wurden untersucht und es konnte nachgewiesen werden, dass alle maternalen Modifikationen in die nächste Generation übertragen wurden. Die Induktion von Mutationen mittels RNA-vermittelter Cas9 in *N. benthamiana* wurde zunächst auf dem zellulären Level demonstriert (Li *et al.* 2013; Nekrasov *et al.* 2013), während *N. tabacum* Pflanzen mit

induzierten Modifikationen erzeugt wurden (Gao *et al.* 2015). Aber die Vererbbarkeit dieser Mutationen wurde bisher in keiner *Nicotiana* Art gezeigt.

Während die Vererbung von NHEJ-vermittelten Mutationen bereits in einer Vielzahl von mono- und dikotyledonen Pflanzen gezeigt wurde, beschränkt sich dies beim gezielten Genaustausch durch HDR auf wenige Arten. Das ZFN-induzierte DSBs beim Vorhandensein einer Reparaturvorlage zu erhöhten *Gene Targeting* Frequenzen führen, wurde erfolgreich demonstriert (siehe Kapitel 1.1.2) und die Vererbung dieser Ereignisse wurde in Mais (Shukla *et al.* 2009) und *Arabidopsis* (de Pater *et al.* 2013) untersucht. Mit der vergleichsweise einfacheren RNA-vermittelten Cas9 Technologie wurden bisher Beispiele in *Arabidopsis* (Schiml *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2016), aber auch in Kulturpflanzen wie Mais (Svitashev *et al.* 2015), Tomate (Cermak *et al.* 2015) und Sojabohne (Li *et al.* 2015) gezeigt.

1.5 *N. tabacum* und *N. benthamiana* als experimentelle Modellpflanzen

N. tabacum und *N. benthamiana* gehören der Gattung *Nicotiana* an, die aus 75 Arten besteht und die fünftgrößte Gattung der Familie der Solanaceae (Nachtschattengewächse) bildet, welche wichtige Kulturpflanzen wie Kartoffel, Tomate, Aubergine, Paprika oder auch Petunien beinhaltet. *N. tabacum* L. stammt ursprünglich aus Amerika, wird aber mittlerweile weltweit für die Tabakindustrie kultiviert. Diese allotetraploide Art entstand aus den diploiden Arten *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* und besitzt durch die Verdopplung der diploiden Chromosomenanzahl $2n = 4x = 48$ Chromosomen (Leitch *et al.* 2008). Bei allotetraploiden Arten erfolgt die Paarung und das *Crossing Over* während der Meiose nur zwischen den homologen Chromosomen des jeweiligen Elters, das heißt eine Rekombination zwischen den beiden elterlichen Chromosomensätzen findet nicht statt. Daher werden solche sich wie Diploide verhaltenden polyploiden Arten auch als amphidiploid bezeichnet. Auch *N. benthamiana* ist eine allotetraploide Art, die in Australien natürlich vorkommt und erstmals durch Benjamin Bynoe (Schiffschirurg auf der HMS Beagle) entdeckt und gesammelt wurde. Informationen darüber, wo die aktuell genutzten Akzessionen von *N. benthamiana* gesammelt oder in welchem Labor sie zuerst verwendet wurden, sind aber gering (Goodin *et al.* 2008). Im Gegensatz zu *N. tabacum* besitzt *N. benthamiana* $2n = 4x = 38$ Chromosomen, doch die genaue Herkunft der beiden parentalen diploiden Genome ist unklar; es handelt sich um eine Art aus der Sektion Sylvestres und eine aus der Sektion Noctiflorae (Goodspeed 1954; Leitch *et al.* 2008). Umso deutlicher ist, dass *N. benthamiana* eine weit verbreitete experimentelle Modellpflanze ist, die intensiv für die Untersuchung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen verwendet wird (Wang & Bennetzen 2015). Verschiedene technische Fortschritte wie z.B. die Expression von Fremd-DNA durch einen pflanzlichen Virusvektor oder das *Virus-Induced Gene Silencing*, bei dem die systematische Abregulierung von pflanzlichen Genen möglich ist, vergrößerten den Anwendungsbereich von *N. benthamiana* in der Pflanzenbiologie. Auch die Agroinfiltration von

N. benthamiana Blättern, welche die transiente Expression von Proteinen ermöglicht, führte zu weiteren Anwendungen dieser Art als Modellpflanze (zusammengefasst in Goodin *et al.* 2008). Die stabile Integration von T-DNA durch Agrobakterium-vermittelten Gentransfer wurde zuvor bereits in *N. tabacum*, unter Verwendung von verschiedenen Explantaten wie Blattstücke oder embryogenen Pollen, erfolgreich demonstriert (Horsch *et al.* 1985; Sangwan *et al.* 1993). Durch die gute Transformierbarkeit eignen sich sowohl *N. tabacum* als auch *N. benthamiana* ausgezeichnet für die Etablierung der TALEN und RNA-vermittelten Cas9 Technologien für die nachfolgende Nutzung in Kulturpflanzen.

1.6 Das grün fluoreszierende Protein

Das grün fluoreszierende Protein (*Green Fluorescent Protein*, GFP) wurde erstmals aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* isoliert und bei Experimenten in pro- und eukaryotischen Zellen dessen Anwendung als Marker für Genexpressionen erkannt (Chalfie *et al.* 1994). Das GFP ist ein 28 kDa großes Protein, welches aus 238 Aminosäuren zusammengesetzt ist und eine β -Fass Struktur bestehend aus 11 β -Strängen bildet (siehe Abb. 4), welche im Inneren das Chromophor beinhaltet (Ormö *et al.* 1996; Yang *et al.* 1996). Dieses Chromophor wird durch das Tripeptid Serin an Position 65, Tyrosin Position 66 und Glycin Position 67 gebildet und ist durch zwei Protein-„Deckel“ (*Loops*), die die Seiten des β -Fasses flankieren, von der umgebenden Flüssigkeit isoliert (Flores-Ramírez *et al.* 2007). Die Bildung des endgültigen Fluorophors erfolgt unabhängig von Enzymen oder Cofaktoren (Heim *et al.* 1994).

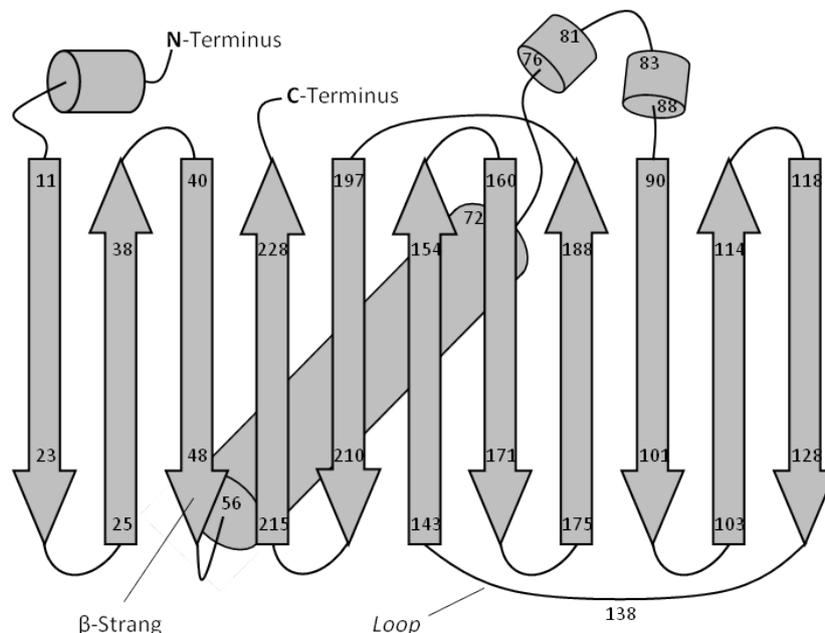


Abb. 4: Sekundärstruktur des GFP (verändert nach Fu *et al.* 2015). Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren, die 11 β -Stränge (als Pfeile dargestellt) bilden, die in der tertiären Proteinstruktur zusammen ein β -Fass formen. Die Nummerierung der Aminosäuren an dem Sockel und der Pfeilspitze kennzeichnen den Anfang und das Ende jedes Stranges. Die einzelnen Stränge sind durch *Loops* miteinander verbunden; der längste *Loop* des GFP reicht von Aminosäure 128 bis 143. Das Chromophor ist in der längsten α -Helix (diagonaler Zylinder) lokalisiert, welche bei der Bildung der Tertiärstruktur im Inneren des β -Fasses eingeschlossen wird.

Mutationen im *GFP* führten zu verbesserten Varianten mit gesteigerter Fluoreszenz, wie z.B. das S65T *gfp*, bei dem das Serin an Position 65 durch ein Threonin ausgetauscht wurde (Cormack *et al.* 1996). Andere Mutationen, die einen Austausch von Aminosäuren im Chromophor oder von räumlich benachbarten Aminosäuren verursachten, führten zu Verschiebungen im Absorptions- und Emissionsspektrum, wodurch z.B. blau oder rot leuchtende Proteine entstanden sind (Heim *et al.* 1994). In den vergangenen Jahren wurde in vielen Organismen *GFP* erfolgreich exprimiert oder als C- oder N-terminaler Tag verwendet, um die Genexpression oder die Lokalisierung von Proteinen zu untersuchen. Für die Etablierung von neuen Technologien, wie die Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen, eignet sich das Reporter-gen deshalb hervorragend.

1.7 Das zentromerspezifische Histon 3

1.7.1 Funktion und Vorkommen von CENH3

Das zentromerspezifische Histon 3 (*Centromere Specific Histone*, CENH3) ist eine Histonvariante, die das kanonische Histon H3 in den Nukleosomen aktiver Zentromere ersetzt. Das Histon H3 bildet zusammen mit anderen Histon-Proteinen ein Oktamer, um welches sich die DNA Helix wickelt. Dieser Komplex wird als Nukleosom bezeichnet und ist ein Bestandteil des Chromosoms und somit für die „Verpackung“ der DNA verantwortlich. Das Zentromer ist eine Region der eukaryotischen Chromosomen, die, durch die Bildung des Kinetochorkomplexes, für die Anhaftung der Spindelfasern und somit für die akkurate Segregation der Schwesterchromatiden während der Mitose und Meiose verantwortlich ist. An einem aktiven Zentromer werden die Nukleosomen mit dem CENH3 beladen (Warburton *et al.* 1997), was in *A. thaliana* hauptsächlich während der späten G2 Phase des Zellzyklus erfolgt (Lermontova *et al.* 2006). Durch den Einbau von CENH3 in die zentromerischen Nukleosomen wird die Bildung des Kinetochorkomplexes initiiert (Howman *et al.* 2000; Blower & Karpen 2001). CENH3 Proteine bestehen aus einer variablen N-terminalen Region und einer Histonfaltungsdomäne (HFD), die zwischen verschiedenen Pflanzenarten, wie z.B. Reis (*Oryza sativa*), *Arabidopsis*, Tabak (*N. tabacum*) und *Luzula nivea* hoch konserviert ist (Nagaki *et al.* 2010). Mehrere α -Helix und *Loop*-Strukturen charakterisieren diese Domäne und insbesondere *Loop* 1 und α 2-Helix, die zusammen die sogenannte CAT-Domäne (*CENP-A Targeting Domain*) bilden, sind wichtig für die Bindung des CENH3 an das Zentromer (Black *et al.* 2004; Lermontova *et al.* 2006). In *Arabidopsis* und Mais wurde gezeigt, dass ein Knock-out von *CENH3* während der zygotischen Entwicklung zur Letalität führt (Ravi & Chan 2010; Ravi *et al.* 2010; Kelliher *et al.* 2016).

In den meisten diploiden Genomen, wie z.B. *A. thaliana*, wird das CENH3 von einem einzigen Gen codiert. Gerste hingegen enthält zwei funktionale Varianten, α CENH3 und β CENH3 (Sanei *et al.* 2011), deren Transkription und Beladung in verschiedenen Geweben unterschiedlich ist (Ishii *et al.* 2015). In der allotetraploiden Art *N. tabacum* sind ebenfalls zwei Varianten vorhanden, wobei

NtCENH3-1 vom diploiden Elter *N. tomentosiformis* und NtCENH3-2 von *N. sylvestris* stammt (Nagaki *et al.* 2009). In derselben Arbeit zeigten Nagaki und Kollegen (2009), dass beide NtCENH3 Varianten etwa gleichstark exprimiert werden. Bei dieser Untersuchung wurden Blattknospen von einem Monat alten Pflanzen verwendet, deshalb kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die beiden Varianten in verschiedenen Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung immer co-exprimiert werden. Bisher liegen keine Untersuchungen des CENH3 in der ebenfalls allotetraploiden Art *N. benthamina* vor, aber die Verdopplung der diploiden parental Chromosomen lässt darauf schließen, dass hier ebenfalls zwei CENH3 Varianten vorliegen.

1.7.2 Uniparentale Genomeliminierung durch Modifikation von CENH3

In den letzten Jahren hat sich die Herstellung von Doppelhaploiden als eine der für die praktische Pflanzenzüchtung effektivsten Biotechnologien erwiesen. Doppelhaploide können mit Hilfe von verschiedenen Methoden, wie z.B. embryogenen Pollenkulturen (Kumlehn 2009) oder interspezifischen Kreuzungen (Kasha & Kao 1970; Dunwell 2010), in einem Schritt hergestellt werden. In der klassischen Züchtung werden homozygote Pflanzen durch mehrere Runden von Selbstbefruchtung und Selektion generiert, was eine beachtliche Menge an Zeit und Ressourcen benötigt. Im Vergleich dazu ist die Verwendung von Doppelhaploiden in Züchtungsprogrammen effizienter, zeitsparender und nachhaltig. Die bislang verfügbaren Methoden zur Herstellung von Doppelhaploiden weisen diverse Limitationen auf, wie z.B. Art- und Genotypenabhängigkeit, verzerrte Repräsentanz freier meiotischer Rekombination in Doppelhaploiden-Populationen sowie begrenzte Möglichkeiten der Kombination von Kern und Zytoplasma, die durch Verbesserung bestehender Protokolle voraussichtlich nicht in wünschenswerter Weise überwunden werden können. Deshalb ist die Etablierung neuer Haploidentechnologien von großer Bedeutung für die moderne Pflanzenzüchtung, aber auch für die Grundlagenforschung. Eine wichtige Rolle spielen dabei Modellpflanzen wie *A. thaliana*.

Ein neues Prinzip zur Herstellung von haploiden Pflanzen wurde in *Arabidopsis* gefunden und experimentell demonstriert (Ravi & Chan 2010), welches auf der uniparentalen Genomeliminierung, als Konsequenz der veränderten Funktionalität des CENH3, basiert. Es wurde gezeigt, dass nach der Kreuzung eines CENH3 Wildtyps mit einem Elter, der anstelle des nativen *CENH3* ein in geeigneter Weise modifiziertes CENH3-Derivat exprimiert, das Genom dieser *Inducer*-Linie während der darauf folgenden zygotischen Embryogenese eliminiert wird. Das verbleibende haploide Wildtyp-Genom kann sich spontan oder durch chemische Induktion verdoppeln und in einer fertilen und vollständig homozygoten Pflanze resultieren (Doppelhaploide). Da die Funktion des CENH3 in höheren Eukaryoten konserviert ist, kann die Methode voraussichtlich auf andere Pflanzenarten übertragen werden, was vor kurzem mit Mais demonstriert wurde (Kelliher *et al.* 2016). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass *Arabidopsis*-Pflanzen, die eine Punktmutation in der CAT-Domäne des CENH3

haben, bei Kreuzungsversuchen mit CENH3 Wildtyppflanzen die Induktion von Haploiden bewirkten (Karimi-Ashtiyani *et al.* 2015). Bei diesem Ansatz führte die Mutation nicht zum Knock-out des *CENH3* und die partielle Komplementierung mit einem CENH3-Derivat war nicht nötig. Bei der Methode der uniparentalen Genomeliminierung durch die Modifikation der Funktionalität des CENH3 wird eine geringere Genotypenabhängigkeit erwartet und durch reziproke Kreuzungen können Haploide sowohl mit maternalem als auch paternalem Zytoplasma erzeugt werden (Ravi & Chan 2010).

1.8 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der TALEN und gRNA-vermittelten Cas9 Technologien in den beiden Tabakarten *N. benthamiana* und *N. tabacum* für die nachfolgende Nutzung in diesen sowie weiteren Modell- und Kulturpflanzen. In den letzten Jahren wurden verschiedene Zielsequenz-spezifizierte Endonuklease Plattformen, wie die TALENs und gRNA/Cas9, entwickelt, die die gezielte genetische Veränderung von Pflanzengenomen vereinfachen. Neben der Grundlagenforschung bieten diese Technologien auch neue Anwendungsmöglichkeiten für die Pflanzenzüchtung.

Für die Etablierung der beiden Plattformen wurde zunächst das *gfp* Gen (hier eine verbesserte Variante mit einem Aminosäureaustausch von Serin an Position 65 durch ein Threonin) beispielhaft verwendet. Die entsprechenden Expressionskassetten für die Zielsequenz-spezifizierte Endonukleasen wurden durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in regenerationsfähige Zellen von Blattsegmenten transferiert, um stabil transgene Pflanzen herzustellen. Induzierte Mutationen in der Zielregion des *gfp* sollten identifiziert und charakterisiert werden. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Vererbbarkeit erzielter *gfp* Mutationen im Vergleich von Selbstbefruchtung, vegetativer Vermehrung und der Herstellung doppelhaploider Nachkommen durch eine embryogene Pollenkultur.

Als Endogen sollte exemplarisch das zentromerspezifische Histon H3 (*CENH3*) modifiziert und resultierende Knock-out Linien ebenfalls mittels Sequenzierung identifiziert und die Mutationen charakterisiert werden. Es handelte sich hierbei um ein essentielles Protein des Kinetochorkomplexes, welches bei Zellteilungen für die Aufteilung der Schwesterchromatiden von zentraler Bedeutung ist und ein funktioneller Knock-out deshalb zu Letalität führen kann. Daher bestand eine weitere Aufgabe darin, das *CENH3* Gen von *N. benthamiana* zu klonieren und zwei chimäre *CENH3*-Derivate zu assemblieren, die in nachfolgenden Studien für eine partielle Komplementierung verwendet werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Ambion (Waltham, MA, USA), BD (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland), BRAND GmbH + Co. KG (Wertheim, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Niederlande), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Einzelne Chemikalien oder Materialien, die von anderen Firmen bezogen wurden, wurden im Text gesondert vermerkt.

2.1.2 Enzyme

Bei den verwendeten Restriktionsenzymen handelte es sich entweder um konventionelle oder *fast digest* Enzyme der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Die Verwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.1.3 Antibiotika

Antibiotika-Stammlösungen wurden mit ddH₂O angesetzt und mittels eines 0,2 µm Spritzenfilters steril filtriert. Abweichungen von dieser Vorgehensweise sind in Tab. 1 gesondert vermerkt.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Antibiotika mit Angabe der Stamm- und Endkonzentrationen.

Antibiotikum	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml	100 µg/ml
Rifampicin*	10 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml	50 µg/ml
Hygromycin**	50 mg/ml	30 mg/l
Bialaphos	10 mg/ml	5 mg/l
Ticarcillin	250 mg/ml	400 mg/l

* in DMSO gelöst, ohne Filtersterilisation

** fertige Stammlösung von Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen

2.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe von Clone Manager 9 (siehe Tab. 4) designt und durch die Firma Metabion (Planegg, Deutschland) synthetisiert. In den folgenden Tabellen sind alle Oligonukleotide aufgelistet, die für den Nachweis von T-DNA Abschnitten mittels PCR oder für Klonierungen von Transformations- oder Testvektoren verwendet wurden.

Tab. 2: Sequenzen von Oligonukleotiden, die für den Nachweis von T-DNA mittels PCR verwendet wurden.

Primerbezeichnung	Sequenz 5'-3'	T _{opt}	amplifizierte Region
GH GFP F1*	GGTCACGAAGTCCAGCAGGA	65 °C	<i>gfp</i> Gen – reverse Primer
GH GFP R2	TACGGCAAGCTGACCCTGAA	65 °C	<i>gfp</i> Gen – forward Primer
GH Ubi10 F1	CTATTGCTTACCAGCCTTAG	68 °C	TALEN-Einheiten – forward Primer
TALEN R1	TGGCGGCTTGGCGCGTGACAG	68 °C	TALEN-Einheiten – reverse Primer
FokI F1	ATCGAGATCGCCCGAACAGCACC	68 °C	<i>FokI</i> Gen – forward Primer
FokI R	ATCATCTCGCCCGGATCAGGAGC	68 °C	<i>FokI</i> Gen – reverse Primer
Nos P F1	CGCCTAAGGTCACTATCAGC	65 °C	<i>HPT</i> Gen – forward Primer
Hyg R1	CCACTATCGGCGAGTACTTC	65 °C	<i>HPT</i> Gen – reverse Primer
35S P F1	GACGTAAGGGATGACGCAC	65 °C	<i>BAR</i> Gen – forward Primer
BAR R2	GAGACGTACACGGTGCAGCT	65 °C	<i>BAR</i> Gen – reverse Primer
Cas9 F2	CAGCTCGTGACAGCTACAAC	65 °C	<i>Cas9</i> Gen – forward Primer
Cas9 R2	TGCCTTCTAAGGATAGCGTG	65 °C	<i>Cas9</i> Gen – reverse Primer
AtU6-26 F1	CAGCTAGAGTCGAAGTAGTG	67 °C	gRNA – forward Primer
35S P R1	GACAGATAGCTGGGCAATGG	67 °C	gRNA – reverse Primer
NbCENH3 F1*	GTGACAGTATCAGTGACAGG	67 °C	<i>CENH3</i> Gen Exon 1 – forward Primer
NbCENH3 R1	CGATTGAGACGCTGAAGATG	67 °C	<i>CENH3</i> Gen Exon 1 – reverse Primer
NbCENH3 F2*	CATCTTCAGCGTCTCAATCG	67 °C	<i>CENH3</i> Gen Exon 3 – forward Primer
NbCENH3 R2	CTGATGAAAGGAGCAGCTGG	67 °C	<i>CENH3</i> Gen Exon 3 – reverse Primer
NbCENH3 F3*	GCGGCAGACATTATGATTAG	67 °C	<i>CENH3</i> Gen Exon 5 – forward Primer
NbCENH3 R3	GCTTGGCCCTTCTCATAACTC	67 °C	<i>CENH3</i> Gen Exon 5 – reverse Primer
SP6	TATTTAGGTGACACTATAGAATAC	-	Sequenzierungsprimer für pGEM-T easy Vektor

* auch als Sequenzierungsprimer verwendet

Tab. 3: Sequenzen von Oligonukleotiden, die für Klonierungen verschiedener Transformationsvektoren und Testvektoren für die transiente Co-Expression verwendet wurden.

Bezeichnung Oligonukleotide	Sequenz 5'-3'	Restriktions-schnittstellen
Transformationsvektor pGH292 (AtUbi10::gfp):		
GH-SpeI-GFP F1	TAAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	<i>SpeI</i>
GH-NcoI-GFP R1	TACCATGGAATACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	<i>NcoI</i>
Transformationsvektoren pSI11 und pSI15 (NbH3-tailswap und AtCENH3-tailswap Konstrukte):		
SacI-NbCENH3-P F	CCGGCGGAGCTCACGACTTACAATAATTTGG	<i>SacI</i>
SpeI-NbCENH3-P R	CTACGTACTAGTGGCTCCGTTGTGTCGCAGAGAAG	<i>SpeI</i>
MCS F	AGCTAGCCATGGGGAGGTGGAGGAGGTGGATACGTAGTCGACAGCTAG	<i>NcoI, Eco105I, Sall</i>
MCS R	CTAGCTGTCGACTACGTATCCACCTCCTCCACCTCCCATGGCTAGCT	<i>NcoI, Eco105I, Sall</i>
SacI-...-NbCENH3-HFD F	ATGATTGAGCTCTACGTAACCGGTACAGGCCTGGGACAGTGGCG	<i>SacI, Eco105I, AgeI</i>
SmaI-NbCENH3-HFD R	CTAGCTCCCGGTCACCAAGGTCGTGCTTTTC	<i>SmaI</i>
Eco105I-NbH3-Ntail F	AGCCGCTACGTAATGGCTCGTACGAAACAACTG	<i>Eco105I</i>
AgeI-NbH3-Ntail R	CTCTAGACCGGTAACGGTCCAGGCCTGTATCTGTG	<i>AgeI</i>
Eco105I-AtCENH3-Ntail F	AGCCGCTACGTAATGGCGAGAACAAGCATC	<i>Eco105I</i>
AgeI-AtCENH3-Ntail R	CTCTAGACCGGTAGGCCTGTATCGATAAGAC	<i>AgeI</i>
Sequenz-spezifische gRNA-vermittelte Cas9-Vektoren:		
GFP proto Fw	ATTGGCTGAAGGGCATCGACTTCA	<i>BbsI</i>
GFP proto Rev	AAACTGAAGTCGATGCCCTTCAGC	<i>BbsI</i>
NbCNEH3 gRNA 1 Fw	ATTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCT	<i>BbsI</i>
NbCNEH3 gRNA 1 Rev	AAACACGCAACAAAGTCGCCAC	<i>BbsI</i>
NbCNEH3 gRNA 2 Fw	ATTGGAGGCTGTGGGCGACTTGG	<i>BbsI</i>
NbCNEH3 gRNA 2 Rev	AAACCAAGTCGCCCCACAGCCTC	<i>BbsI</i>
NbCNEH3 gRNA 3 Fw	ATTGTCCTCGGACTTGTCTTGT	<i>BbsI</i>
NbCNEH3 gRNA 3 Rev	AAACACAAGAACAAGTCCGAGGAC	<i>BbsI</i>
NbCNEH3 gRNA 4 Fw	ATTGGCTTCCAGCGAGTTACCTC	<i>BbsI</i>
NbCNEH3 gRNA 4 Rev	AAACGAGGTAACCTGCTGGCAAGC	<i>BbsI</i>
spezifische Zielsequenzen für Testvektoren:		
pTARGET-gfp1 F	GATCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC AA	<i>BamHI</i>
pTARGET-gfp1 R	AATTTGCGCTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTACCA	<i>EcoRI</i>
pTARGET-NbCENH3-1 F	GATCTGGCGAGAACCAACACCTAGCCCTACGCAACAAAGTCGCCACCAA GTCGCCCCACAGCCTC	<i>BamHI</i>
pTARGET-NbCENH3-1 R	AATTGAGGCTGTGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTCGCTAGGGCTAGG TGTTTGGTTCTCGCCA	<i>EcoRI</i>

Bezeichnung Oligonukleotide	Sequenz 5'-3'	Restriktions- schnittstellen
pTARGET-NbCENH3-2 F	<u>GATCT</u> CCTACAAGAACAAGTCCGAGGAC	<i>Bam</i> HI
pTARGET-NbCENH3-2 R	AAT <u>TGT</u> CCTCGGACTTGTCTTGTAGGA	<i>Eco</i> RI
pTARGET-NbCENH3-3 F	<u>GATCT</u> CCAGAGGTAACCTCGCTGGCAAGC	<i>Bam</i> HI
pTARGET-NbCENH3-3 R	AAT <u>TGCTT</u> GCCAGCGAGTTACCTCTGGA	<i>Eco</i> RI

2.1.5 Software

Tab. 4: Liste der verwendeten Software.

Software	Firma	Firmensitz
Adobe Photoshop CS	Adobe Systems	San José, CA, USA
Chromas 2.33	Technelysium Pty Ltd	South Brisbane, Australien
Clone Manager 9 Professional Edition	Scientific & Educational Software	Morrisville, NC, USA
Endnote® X5	Thomson Reuters	Philadelphia, PA, USA
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA

2.1.6 Medien und Puffer

2.1.6.1 Medien für die Anzucht und Transformation von Bakterien

LB Medium, flüssig (für 1 Liter)

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	10,0 g
→ autoklavieren	

LB Medium, fest (für 1 Liter)

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	10,0 g
Agar	10,0 g
→ autoklavieren	

SOC Medium (für 1 Liter)

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
KCl (1 M)	2,5 ml
MgCl ₂ (1 M)	10,0 ml
MgSO ₄ (1 M)	10,0 ml
→ autoklavieren	
Glukose (1 M), steril filtriert	20,0 ml

YEB Medium (für 1 Liter; Sparkes *et al.* 2006)

Hefeextrakt	1,0 g
Rinderextrakt	5,0 g
Pepton	5,0 g
Saccharose	5,0 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
→ pH 7,0 einstellen	
→ autoklavieren	

2.1.6.2 Medien für die Anzucht, Transformation und Regeneration von Tabak

Tabakmedium (für 1 Liter)

MS Salze inkl. Vitamine	4,4 g
Saccharose	30,0 g
Difco Bacto Agar	8,0 g
→ pH 5,8 einstellen	
→ autoklavieren	
BAP (1mg/ml)	1,0 ml
NAA (1mg/ml)	0,1 ml

MS Medium (für 1 Liter)

MS Salze inkl. Vitamine	4,4 g
Saccharose	20,0 g
Difco Bacto Agar	8,0 g
→ pH 5,8 einstellen	
→ autoklavieren	

2.1.6.3 Puffer für die elektrophoretische Auftrennung von DNA

5x TBE Puffer (für 1 Liter)

Tris	54,50 g
Borsäure	27,50 g
EDTA	4,65 g

2.1.6.4 Puffer für die DNA Gelblot Analyse

Denaturierungspuffer (für 1 Liter)

NaOH	20,0 g
NaCl	87,7 g

Neutralisationspuffer (für 1 Liter)

Tris-HCl	63,5 g
NaCl	175,4 g
Tris	11,8 g

20x SSC Puffer (für 1 Liter)

NaCl	175,2 g
Na-Citrat	88,2 g
→ pH 7 einstellen	

Blaumarker (für 100 ml)

Glycerol (autoklaviert)	30,00 ml
ddH ₂ O (autoklaviert)	70,00 ml
Bromphenolblau	0,25 g
Xylencyanol	0,25 g
→ aliquotiert bei -20 °C lagern	

2.1.6.5 Puffer für die Extraktion von genomischer DNA

Extraktionspuffer (für 1 Liter; Pallotta *et al.* 2000)

N-Lauryl-Sarcosin	10,0 g
Tris-HCl (1 M, pH 8)	100,0 ml
EDTA (0,5 M, pH 8)	20,0 ml
NaCl (1 M)	100,0 ml

2.1.7 Verwendete Vektoren

2.1.7.1 Transformationsvektor pGH292 (*AtUbi10P::gfp*)

Der Transformationsvektor pGH292 wurde zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe kloniert und für die Herstellung von *gfp* Reporterlinien von Tabak bereitgestellt. Es handelt sich dabei um eine modifizierte Variante des Wildtyp GFP aus *Aequorea victoria*, bei der das Serin an Position 65 durch ein Threonin (S65T *gfp*) ausgetauscht wurde, was zu einer erhöhten Fluoreszenz führt (Cormack *et al.* 1996). Die entsprechende *gfp* Sequenz wurde unter Verwendung des Primerpaares GH-SpeI-GFP F1/GH-NcoI-GFP R1 (siehe Tab. 3) amplifiziert und in das Plasmid pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) integriert, um das Plasmid pGH124 zu bilden. Anschließend wurde das *gfp*-beinhaltende *SpeI/EcoRI* Fragment von pGH124 in den pNos-AB-M (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland; Anhang Abb. A 2a) kloniert, um pGH119 (siehe Anhang Abb. A 3a) zu erhalten. Nachfolgend wurde aus pGH119 ein *SpeI/HindIII* *gfp*-umfassendes Fragment in den pUbiAT-OCS (DNA Cloning Service) subkloniert, wobei das Fragment zwischen den *A. thaliana* *UBIQUITIN-10* Promoter und die *A. tumefaciens* *OCTOPIN-SYNTHASE* Terminatorsequenz eingefügt und das resultierende Plasmid als pGH167 (Anhang Abb. A 3b) bezeichnet wurde. Ein *SfiI* Fragment von pGH167, welches die komplette *gfp* Expressionskassette beinhaltete, wurde in den binären Vektor pLH9000 (DNA Cloning Service; Anhang Abb. A 1a) integriert, um den Transformationsvektor pGH292 herzustellen (Abb. 5). Dieser wurde anschließend mittels Hitzeschock in den *A. tumefaciens* Stamm GV2260 transformiert (siehe Kapitel 2.2.17.2).



Abb. 5: Schematische Darstellung des Transformationsvektors pGH292. Der Vektor wurde für die Herstellung einer Tabak *gfp* Reporterlinie verwendet. LB: linke Abgrenzung der T-DNA (*Left Border*); RB: rechte Abgrenzung der T-DNA (*Right Border*); 35S P: *CaMV* 35S Promoter; NPT II: *NEOMYCIN-PHOSPHOTRANSFERASE* II Gen aus *E. coli* (vermittelt Resistenz gegen Kanamycin); 35S T: terminale Sequenz des *CaMV* 35S; AtUbi10 P: *UBIQUITIN-10* Promoter von *A. thaliana*; GFP: synthetisches Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (*Green Fluorescent Protein*); OCS T: terminale Sequenz des *OCTOPIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*.

2.1.7.2 *Gfp*-spezifische TALEN Konstrukte (pSP10 und pSP11)

Das *gfp*-spezifische TALEN-Paar, welches für die Etablierung der TALEN Plattform Verwendung fand, wurde zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe kloniert und für diese Arbeit bereitgestellt. Hierfür wurden zunächst die Zielsequenzen ausgewählt und durch die Firma Collectis Bioresearch (Paris, Frankreich) assembliert. Als Grundgerüst für beide TALEN-Einheiten diente eine modifizierte Version des TALE Proteins von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs3. Die Funktionalität sowie die Effizienz des TALEN-Paares wurden mittels einem *Single Strand Annealing* (SSA) Assay in Hefe (von Collectis) verifiziert, mit dem Ergebnis, dass das *gfp*-spezifische TALEN-Paar eine gute Spaltungsaktivität hat.

Die linke (pTAL.pLess.009677) und rechte (pTAL.pLess.009678) TALEN-Einheit wurde jeweils in den Vektor pUbiAt-OCS (DNA Cloning Service, Hamburg Deutschland; siehe Anhang Abb. A 2b) eingefügt, unter Verwendung der *HindIII/Spel* Restriktionsenzyme, um eine Expressionskassette zu erhalten, die unter der Kontrolle des *UBIQUITIN-10* Promoters aus *A. thaliana* steht; das *OCTOPIN-SYNTHASE* Gen aus *A. tumefaciens* lieferte die terminale Sequenz (OCS Terminator). Da die synthetisierten TALEN-Einheiten kein Kernlokalisierungssignal (NLS, für *Nuclear Localization Signal*) beinhalteten, musste dieses nachträglich eingefügt werden. Dafür wurden die beiden Zwischenvektoren (pUbiAt-TALEN-L und pUbiAt-TALEN-R) sowie die synthetischen Sequenzen, die für das Simianvirus S40 (SV40) NLS bzw. NLS-HA (SV40 NLS zusammen mit einem Hämagglutinin-Tag) codierten, mit *Ascl* und *Eco47III* verdaut. Die anschließende Ligation führte dazu, dass NLS-HA an den N-Terminus von pUbiAt-TALEN-L und NLS an den N-Terminus von pUbiAt-TALEN-R angefügt wurde. Jede TALEN Expressionskassette wurde mit Hilfe der *SfiI* Restriktionsschnittstellen (Varianten A und B) gerichtet in den binären Vektor p6N (DNA Cloning Service; Anhang Abb. A 1b) kloniert, welcher das *HYGROMYCIN-PHOSPHOTRANSFERASE* Gen (vermittelt Resistenz gegenüber Hygromycin), unter der Kontrolle des NOS Promoters (*NOPALIN-SYNTHASE* Gen aus *A. tumefaciens*) beinhaltete. Die entstandenen Transformationsvektoren pSP10 (TALEN-R) und pSP11 (TALEN-L; Abb. 6) wurden mittels Hitzeschock in den *A. tumefaciens* Stamm GV2260 integriert.

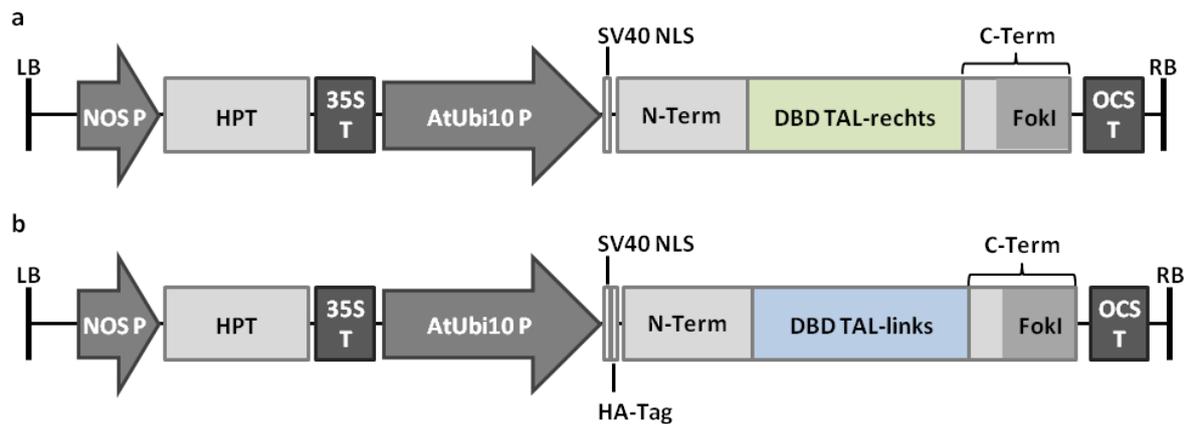


Abb. 6: Schematische Darstellung der *gfp*-spezifischen TALEN Vektoren pSP10 und pSP11. Die beiden Vektoren wurden für die Etablierung der TALEN Plattform verwendet. a) Aufbau des rechten TALEN Vektors (pSP10) mit SV40 NLS. b) Aufbau des linken TALEN Vektors (pSP11) mit SV40 NLS und HA-Tag. LB: linke Abgrenzung der T-DNA (*Left Border*); RB: rechte Abgrenzung der T-DNA (*Right Border*); NOS P: *A. tumefaciens* Promotersequenz des *NOPALIN-SYNTHASE* Gens; HPT: *HYGROMYCIN-PHOSPHOTRANSFERASE* Gen aus *E. coli*; 35S T: terminale Sequenz des *CaMV 35S*; AtUbi10 P: *UBIQUITIN-10* Promoter von *A. thaliana*; SV40 NLS: Kernlokalisationssignal von Simianvirus S40; HA-Tag: Hämagglutinin-Tag; N-Term, C-Term: N-Terminus bzw. C-Terminus des TALE Proteins AvrBs3 aus *X. campestris* pv. *vesicatoria*; DBD TAL-rechts/-links: DNA Bindedomäne der rechten bzw. linken TALEN-Einheit; FokI: DNA Spaltungsdomäne aus *Flavobacterium okeanoikoites* Typ IIS Restriktionsendonuklease; OCS T: terminale Sequenz des *OCTOPIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*.

2.1.7.3 Testvektor pTARGET-gfp1

Der Testvektor pTARGET-gfp1 wurde für die transiente Co-Expression mit Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen (siehe Kapitel 3.1.2) kloniert, welches eine Validierung dieser Endonukleasen ermöglicht. Dieser Vektor wurde zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe generiert, um *gfp*-spezifische TALENs für Gerste zu testen. Da die Zielsequenz in diesem Vektor die der *gfp*-spezifischen TALENs sowie der gRNA/Cas9 für Tabak entspricht, konnte pTARGET-gfp1 auch für die Validierung dieser Endonukleasen verwendet werden.

Als Grundlage für die Klonierung von pTARGET-gfp1 diente der generische Vektor pNB1 (GenBank: KU705395), welcher ein modifiziertes *yfp* Reportergen unter der Kontrolle des doppelt verstärkten *CaMV 35S* Promoters trägt. Des Weiteren enthält der Vektor das *Legumin B4* Signalpeptid (*LeB4*) von *Vicia faba* sowie ein KDEL Motiv am C-terminalen Ende des *yfp*, für die Retention des Proteins in das endoplasmatische Retikulum (Abb. 7a). Mit Hilfe der *Bam*HI/*Eco*RI Klonierungsstelle wurde das 51 bp große Fragment, welches die Zielregion für die *gfp*-spezifischen Endonukleasen enthielt, zwischen *LeB4* und *yfp* integriert.

2.1.7.4 mCherry Vektor

Der *mCherry* Vektor (pNB2) wurde zur Normalisierung des Partikelbeschusses und somit für die nachfolgende Berechnung der Effizienz der Zielsequenz-spezifischen Endonukleasen verwendet (siehe Kapitel 3.1.2). Die Klonierung des Vektors erfolgte zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe und stand für die Verwendung beim Partikelbeschuss zur Verfügung. Die Expressionskassette besteht aus dem doppelt verstärkten *CaMV 35S* Promoter, dem *mCherry* Gen und der terminalen Sequenz der *NOPALIN-SYNTHASE* aus *A. tumefaciens* (Abb. 7b).

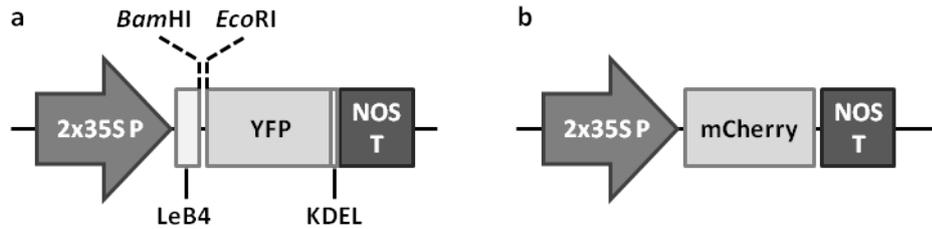


Abb. 7: Schematische Darstellung des generischen Vektors pNB1 und der mCherry Expressionskassette (pNB2). a) Der Vektor pNB1 diente als Grundlage für die Herstellung Sequenz-spezifischer Testvektoren. Die entsprechenden Zielsequenzen (siehe Tab. 3) wurden über die *Bam*HI/*Eco*RI Schnittstellen in den Vektor kloniert. b) Die *mCherry* Expressionskassette diente zur Normalisierung des Partikelbeschusses bei der transienten Co-Expression von Sequenz-spezifischen Endonukleasen und den entsprechenden Testvektoren. 2x35SP: doppelt verstärkter *CaMV* 35S Promoter; LeB4: *Vicia faba Legumin B4* Signalpeptid; YFP: synthetisches Gen für ein gelb fluoreszierendes Protein (*Yellow Fluorescent Protein*); NOS T: *A. tumefaciens NOPALIN-SYNTHASE* terminale Sequenz; mCherry: Gen für ein rot fluoreszierendes Protein.

2.1.7.5 CENH3-Komplementationskonstrukte (pSI11 und pSI15)

Zwei CENH3-Komplementationskonstrukte wurden generiert und entweder einzeln oder in Kombination mit den *NbCENH3*-spezifischen TALEN oder gRNA/Cas9 Konstrukten in die Pflanzellen transferiert. Dafür wurde zunächst ein 1547 bp großes Fragment des *NbCENH3* Promoters amplifiziert und dabei die Restriktionsschnittstellen *Sac*I und *Spe*I angefügt (Primer siehe Tab. 3). Unter Verwendung dieser Klonierungsstellen wurde das PCR-Amplifikat anschließend in den Vektor pGH120 ligiert und dadurch der Zwischenvektor pSI03 hergestellt, welcher neben dem *NbCENH3* Promoter auch das synthetische S65T *gfp* Gen und den NOS Terminator aus *A. tumefaciens* beinhaltet. Im nächsten Schritt wurde eine *Multiple Cloning Site*, die einen Glycin-Linker und extra Restriktionsschnittstellen enthält, zwischen die *gfp* Sequenz und den NOS Terminator kloniert, wobei die Restriktionsenzyme *Nco*I/*Sal*I verwendet wurden und der Zwischenvektor pSI04 (siehe Anhang Abb. A 4a) entstand. Für die Klonierung der eigentlichen CENH3-Derivate wurde zunächst die HFD des *NbCENH3* amplifiziert (Primer siehe Tab. 3) und danach mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Sac*I/*Sma*I in den Vektor pNOS-AB-M (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland; Anhang Abb. A 2a) ligiert, wobei der Zwischenvektor pSI05 (Anhang Abb. A 4b) entstand.

Für das NbH3-tailswap Konstrukt wurde anschließend der N-Terminus des kanonischen Histons H3 aus *N. benthamiana* amplifiziert und über die Schnittstellen *Eco*105I und *Age*I in den Vektor pSI05 kloniert, um den Zwischenvektor pSI06 herzustellen. Dieser wurde dann mit *Stu*I verdaut, aufgereinigt und wieder ligiert, um einen narbenfreien Übergang zwischen dem NbH3 N-Terminus und der HFD zu schaffen. Dieser Zwischenvektor, pSI07 (Anhang Abb. A 4c), wurde danach mit *Eco*105I und *Sal*I verdaut, das entsprechende Fragment aus dem Gel extrahiert und anschließend mit dem linearisierten Vektor pSI04 (siehe vorheriger Absatz) ligiert, um den Vektor pSI08 herzustellen. pSI08 wurde in den binären Vektor pLH7000 (DNA Cloning Service; Anhang Abb. A 1c) unter Verwendung der *Sfi*I Restriktionsschnittstellen eingefügt. Der entstandene Transformationsvektor pSI11 beinhaltet das *PHOSPHINOTHRICIN-ACETYLTRANSFERASE* Gen (*PAT*) aus *Streptomyces viridochromogenes*, welches eine pflanzliche Resistenz gegen Bialaphos vermittelt. Dieses *PAT* Gen

steht unter der Kontrolle des Promoters und Terminators aus dem *CaMV 35S*. Das CENH3-Derivat selbst, bestehend aus *gfp*, *NbH3* N-Terminus und *NbCENH3* HFD, wird durch den nativen Promoter des *NbCENH3* und dem *NOS* Terminator aus *A. tumefaciens* reguliert (Abb. 16a).

Zur Herstellung des AtCENH3-tailswap Konstrukts wurde der N-Terminus des *CENH3* aus *A. thaliana* amplifiziert (Primer siehe Tab. 3) und ebenfalls unter Verwendung der *Eco105I/Agel* Restriktionsenzyme in den Zwischenvektor pSI05 kloniert, wobei pSI12 entstand. Dieser Zwischenvektor wurde mit *StuI* verdaut und re-ligiert, um die Klonierungsnarbe zwischen N-Terminus und HFD zu entfernen (pSI13; Anhang Abb. A 4d). Anschließend erfolgte die Integrierung des N-Terminus und der HFD in den Vektor pSI04, um den Vektor pSI14 herzustellen. Dieser wurde über die *SfiI* Restriktions-schnittstellen ebenfalls in den binären Vektor pLH7000 (DNA Cloning Service; Anhang Abb. A 1c) kloniert, um den Transformationsvektor pSI15 zu erhalten (Abb. 16b). Die beiden Transformationsvektoren pSI11 (*NbH3*-tailswap) und pSI15 (*AtCENH3*-tailswap) wurden mittels Hitzeschock in den Agrobakterienstamm GV2260 transformiert (siehe Kapitel 2.2.17.2).

2.1.7.6 *NbCENH3*-spezifische TALEN Konstrukte (pSI18 und pSI19)

Die linke (pTAL.pLess.021155) und rechte (pTAL.pLess.022196) TALEN-Einheit wurde jeweils unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *SpeI/PstI* in den Vektor pUbiAt-OCS (DNA Cloning Service, Hamburg Deutschland; siehe Anhang Abb. A 2b) eingefügt. Die entstandene Expressionskassette bestand aus dem *UBIQUITIN-10* Promoter von *A. thaliana*, der jeweiligen TALEN-Einheit und der terminalen Sequenz des *OCTOPIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*. Jede TALEN Expressionskassette wurde mit Hilfe der *SfiI* Restriktionsschnittstellen in den binären Vektor p6N (DNA Cloning Service; Anhang Abb. A 1b) kloniert, welcher durch das enthaltene *HYGROMYCIN-PHOSPHOTRANSFERASE* Gen eine pflanzliche Resistenz gegen Hygromycin vermittelt; das Resistenzgen ist unter Kontrolle des *NOS* Promoters (*NOPALIN-SYNTHASE* Gen aus *A. tumefaciens*). Die entstandenen Transformationsvektoren pSI18 (TALEN-L) und pSI19 (TALEN-R; siehe Abb. 19) wurden mittels Hitzeschock in den *A. tumefaciens* Stamm GV2260 integriert (siehe Kapitel 2.2.17.2).

2.1.8 Bakterienstämme

E. coli Stamm: XL1-Blue (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)]*

A. tumefaciens Stamm: GV2260, C58C1 [pGV2260]

Genotyp: C58C1 pTiB6s3ΔT Cb^R (Deblaere *et al.* 1985)

2.1.9 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

2.1.9.1 Anzucht von *N. benthamiana* und *N. tabacum* im Gewächshaus

Als Donormaterial für die Transformationen diente zum einen der Wildtyp von *N. benthamiana*, zum anderen wurde der Wildtyp von *N. tabacum* SR1 für die Versuche verwendet. *N. benthamiana* und

N. tabacum sind Lichtkeimer, weshalb die Samen lediglich auf feuchtes Anzuchtsubstrat (Substrat 1, Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) gelegt und leicht angedrückt wurden. Nach etwa zwei Wochen wurden die Keimlinge pikiert (Topf Ø 6 cm) und für weitere zwei Wochen bei 22/20 °C und einer 16 h Photoperiode mit 35.000 Lux angezogen. Nach vier Wochen erfolgte ein Umtopfen der Pflänzchen (Topf Ø 14 cm, Substrat 2, Klasmann-Deilmann GmbH) und eine weitere Anzucht für etwa 10 Wochen (20/18 °C, 16 h Photoperiode, 30.000 Lux), um Nachkommen durch Selbstbestäubung zu erhalten.

2.1.9.2 Sterile Anzucht von *N. benthamiana* und *N. tabacum*

Die Samen von *N. benthamiana* und *N. tabacum* wurden zunächst oberflächensterilisiert, indem 500 µl Meliseptol (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zu einer kleinen Menge Samen gegeben und das Gemisch für etwa 15 s stark geschüttelt wurde. Unter sterilen Bedingungen wurde die Lösung abgenommen und die Samen dreimal mit ddH₂O gewaschen. Nachdem die Samen getrocknet waren, wurden sie für zwei Wochen auf MS Medium gekeimt. Die Keimlinge wurden in Boxen (107 x 94 x 96 cm) mit MS Medium umgesetzt und für 6-8 Wochen angezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion genomischer DNA

Für die Extraktion von genomischer DNA wurden Blattproben von 4-5 Wochen alten Pflanzen verwendet. Pro Pflanze wurden zwei Blattscheiben (Ø 11 mm) aus 1-2 Blättern ausgestanzt und in einem 2 ml Sicherheitsreaktionsgefäß mit einer Stahlkugel in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte in gefrorenem Zustand unter Verwendung einer Schwingmühle (MM400 von Retsch, Haan, Deutschland) bei 27 Hertz für zwei Minuten. Die genomische DNA wurde nach einer Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (26:24:1; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)-basierten Methode extrahiert (Pallotta *et al.* 2000) und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Extraktion von RNA

Die Extraktion von RNA erfolgte unter Verwendung von Phenol/Guanidin-Isothiocyanat (entweder als TRIzol[®] Reagent (Ambion, Waltham, MA, USA) oder als GENEzol[™] Reagent (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan)) nach den Angaben der Hersteller. Die Blattproben wurden wie im Kapitel zuvor für die DNA Extraktion beschrieben abgenommen. Die extrahierte RNA wurde in 100 µl 1x TE-Puffer gelöst und 10 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine DNase Behandlung der RNA Proben nach Angaben des Herstellers mit dem DNA-free[™] Kit (Ambion).

2.2.3 cDNA Synthese

Die extrahierte und mit DNase I behandelte RNA wurde verwendet um Erststrang cDNA zu generieren; anschließend erfolgten die Degeneration der RNA-Vorlage und die Synthese des DNA

Komplementärstranges. Für die cDNA Synthese wurde das iScript™ Select cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. 1 µg RNA diente als Matrize in einem 20 µl Reaktionsansatz:

RNA [1 µg/µl]	1,0 µl
Nuklease-freies Wasser	12,0 µl
iScript Select Reaktionsmix (5x)	4,0 µl
Oligo (dT) 20 Primer	2,0 µl
iScript Reverse Transkriptase	1,0 µl

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 60-90 min bei 42 °C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase durch eine Hitzebehandlung bei 85 °C für 5 min. Das cDNA Produkt wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure

Um die Qualität und Quantität von extrahierten Nukleinsäuren zu bestimmen, wurden 1:100 Verdünnungen der Proben mittels Photometer (Biophotometer & UVette 220-1600 nm, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 260 nm und 280 nm nach den Angaben des Herstellers gemessen.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Bei allen durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde die GoTaq Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) und der dazugehörige Puffer in einem 20 µl Reaktionsansatz verwendet:

Go Taq Green Puffer (5x)	4,00 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,00 µl
dNTPs (10 mM)	0,70 µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	0,70 µl
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	0,70 µl
Go Taq Polymerase (5 U/µl)	0,17 µl
DNA	50-100 ng
Nuklease-freies Wasser	bis 20 µl

Abhängig von der Länge des PCR-Produktes oder der Beschaffenheit der Primer, wurden die Elongationszeit, die Hybridisierungstemperatur und die Anzahl der Zyklen angepasst, um die maximale Ausbeute zu erhalten. Die Optimierung der Hybridisierungstemperatur (T_{opt}) erfolgte mittels Gradienten-PCR. Alle Standard-PCR-Programme leiteten sich von dem folgenden Schema ab und wurden im Mastercycler® ep (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

initiale Denaturierung	95 °C	5 min	} 30-35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30-45 s	
Hybridisierung	T_{opt} °C	30-45 s	
Elongation	72 °C	30 s-2 min	
finale Elongation	72 °C	8-10 min	
abkühlen	4 °C	∞	

2.2.6 DNA Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA wurden 0,8-1,5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Dafür wurde die Agarose eingewogen und mit 0,5x TBE Puffer aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Für die Visualisierung der DNA wurden 12-15 µl Stain Clear G (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) zu 400 ml flüssigem Agarosegel hinzugefügt. Zum Aushärten wurde das Gel in einen Schlitten mit entsprechendem Kamm gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 200 V durchgeführt, wobei 0,5x TBE als Elektrophoresepuffer diente. Die Dokumentation des Ergebnisses erfolgte mit Hilfe des Intas Geldokumentationssystems (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland).

2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Die aufgereinigten Produkte wurden für einen kurzen Zeitraum bei 4 °C bzw. für längere Zeit bei -20 °C gelagert.

2.2.8 T7E1 Assay

Die T7 Endonuklease I (T7E1, NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) erkennt und schneidet unter anderem Heteroduplex DNA (Mashal *et al.* 1995) und kann somit verwendet werden, um Pflanzen zu detektieren die, z.B. nach Transformation mit Sequenz-spezifischen Endonukleasen, eine oder mehrere Mutationen in der Zielsequenz aufweisen. Für den T7E1 Assay wurde zunächst ein 19 µl Ansatz vorbereitet, der unter folgenden Bedingungen im Mastercycler® ep (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert wurde:

DNA (gereinigtes PCR-Produkt)	100 ng
NEB Puffer 2 (10x)	2 µl
Nuklease-freies Wasser	bis 19 µl

initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Hybridisierung I	95-85 °C	-2,0 °C/s
Hybridisierung II	85-25 °C	-0,1 °C/s
abkühlen	4 °C	∞

Nach der Denaturierung und der Re-Hybridisierung der DNA wurden 0,5 µl der T7E1 (10 U/µl) zu den Proben gegeben und diese für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde Ladepuffer hinzugefügt und die Proben auf ein 1,5 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen. Die Auswertung des Assays erfolgte anhand des Gelbildes.

2.2.9 TA-Klonierung

Bei der Amplifikation von PCR-Produkten, insbesondere bei der Verwendung von Taq-Polymerase, werden oftmals einige nichtkomplementäre Desoxyadenosinnukleotide an den 3'-Enden der Fragmente hinzugefügt, welche eine Ligation mit linearisierten Vektoren, die mit kompatiblen

Überhängen ausgestattet sind, ermöglichen. Eine solche TA-Klonierung wurde verwendet, um PCR-Produkte zu vereinzeln und individuelle Amplifikate anschließend zu untersuchen. Dafür wurde das pGEM[®]-T Easy Vector System von Promega (Madison, WI, USA) verwendet und den Angaben des Herstellers gefolgt. Je nach DNA Konzentration und Insertgröße wurden 1-2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt verwendet, um ein molares Verhältnis von 1:3 (Vektor zu Insert) zu erhalten. Der Ligationsansatz wurde für mindestens 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C inkubiert.

2.2.10 Blau-Weiß-Selektion

Transformierte *E. coli* Zellen (siehe Kapitel 2.2.17.1) wurden auf LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Auf dem Medium wurden zuvor außerdem noch 40 µl Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; 0,1 M Stocklösung) und 40 µl X-Gal (20 mg/ml Stocklösung) verteilt. Die Petrischalen mit den transformierten Zellen wurden ÜN bei 37 °C inkubiert. Das IPTG diene als Induktor für den Promoter der β-Galaktosidase, welche in der Lage ist den gelben Farbstoff X-Gal in Galaktose und einen blauen Farbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo) zu spalten. Durch die erfolgreiche Insertion eines Amplifikats in den pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega, Madison, WI, USA) wurde die darin enthaltene β-Galaktosidase inaktiviert, wodurch die transgenen Bakterien leicht von den nicht transgenen unterschieden werden konnten. Einzelne weiße (positive) Kolonien wurden mit Hilfe eines Holzzahstochers in flüssiges LB-Medium (inklusive Antibiotikum) überführt und ÜN bei 37 °C und 180 rpm vermehrt.

2.2.11 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Sequenzen von Vektoren oder zur Charakterisierung von induzierten Mutationen wurden von extrahierter pDNA oder aufgereinigten PCR-Produkten Sanger-Sequenzierungen durch den internen IPK Sequenzierungsservice (Gatersleben, Deutschland) oder die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe der Programme Chromas, Clone Manager 9 (siehe Kapitel 2.1.5) und/oder der Internetplattform ClustalW ausgewertet (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>).

2.2.12 DNA Gelblot Analyse

Mit Hilfe der DNA Gelblot Analyse ist es möglich, die Insertion von T-DNAs im Pflanzengenom zu belegen und darüber hinaus die Kopienanzahl einer T-DNA in stabil transgenen Pflanzen zu bestimmen. Hierfür sind mehrere Schritte notwendig, die in den folgenden Unterkapiteln detaillierter beschrieben werden.

2.2.12.1 Restriktion und Auftrennung genomischer DNA

Zunächst musste eine geeignete Restriktionsschnittstelle gefunden werden, die das Genom in mehrere unterschiedlich große Fragmente teilt. Dabei ist es wichtig, dass das Enzym möglichst nur einmal innerhalb der T-DNA schneidet und aufgrund der im genomischen Kontext nächstgelegenen Schnittstelle Fragmente insertionsspezifischer Länge, idealerweise in einer Größenordnung von 3-4 kb, entstehen. Bei kleineren Fragmenten besteht die Gefahr, dass sie während des Gellaufes aus dem Gel auslaufen, während größere Fragmente schwerer zu differenzieren sind und so zu einem verfälschten Ergebnis führen können. War eine Restriktionsschnittstelle mehrfach in der T-DNA vorhanden, so musste sichergestellt werden dass kein T-DNA internes, die Erkennungssequenz der DNA Sonde enthaltene Fragment entsteht, da sich dadurch weder die Kopienanzahl integrierter T-DNAs bestimmen, noch genomisch integrierte T-DNA von der in persistierenden Agrobakterien unterscheiden ließe. Des Weiteren musste die Methylierungssensitivität des Restriktionsenzym beachtet werden. Für den DNA Gelblot wurde genomische DNA mit einer Konzentration von etwa 1 µg/µl in einem 50 µl Ansatz verwendet. Der Verdau erfolgte ÜN bei 37 °C (wenn nicht anders angegeben) und die Inaktivierung des Restriktionsenzym entsprechend den Angaben des Herstellers.

genomische DNA (1µg/µl)	20,0 µl
Puffer (10x)	5,0 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	2,5 µl
Nuklease-freies Wasser	22,5 µl

Die elektrophoretische Auftrennung der verdauten DNA erfolgte in einem 0,8 %igen, mit 0,5x TBE Puffer angefertigten Agarosegel. Je 50 µl DNA Probe wurden 6 µl Blaumarker dazugegeben und die Proben aufgetragen. Als Marker diente der DIG-Marker II (Roche, Mannheim, Deutschland). Zunächst wurde das Gel eine Stunde lang bei 100 V, danach mindestens 20 h (Orientierung nach 4 kb Bande des Blaumarkers) bei 23 V laufen gelassen. Das Ergebnis wurde als Bilddatei festgehalten.

2.2.12.2 Kapillarblot

Vor dem Kapillarblot musste das Gel vorbereitet werden, indem es zunächst für 10-20 min in 0,25 M HCl geschwenkt und anschließend gründlich mit ddH₂O gewaschen wurde. Danach erfolgte die Denaturierung der DNA mittels Denaturierungspuffer. Das Gel wurde zweimal 15 min darin geschwenkt und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Es folgte die Neutralisation des Gels durch Schwenken im Neutralisationspuffer (2x15 min).

Für den Blot wurden verschiedene Fließpapiere sowie eine Nylon-Membran (Roche, Mannheim, Deutschland) zugeschnitten, die vor dem Aufbau des Blots kurz in ddH₂O und dann für 10-20 min in 20x SSC Puffer gelegt wurde. Der Transfer der DNA vom Gel auf die positiv geladene Nylon-Membran erfolgte nach den Angaben des Herstellers entweder für drei Stunden oder ÜN mit dem Whatman™

TurboBlotter Transfer System (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Als Transferpuffer diente 20x SSC Puffer. Nach dem Transfer wurden die Spuren auf der Membran markiert und die DNA durch dreiminütige Inkubation in einem UV-Ofen (ehemals peqlab Biotechnologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) auf der Membran fixiert. Anschließend wurde die Membran in sterilem ddH₂O gewaschen und zum Trocknen auf Filterpapier gelegt.

2.2.12.3 Herstellung von DIG-markierten Sonden

Zur Herstellung der Sonden wurde das PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Als Matrize für die PCR-Reaktionen diente pDNA der entsprechenden Transformationsvektoren. Als Reaktionsansatz wurden 50 µl verwendet, von denen 5 µl zur Überprüfung der PCR auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen wurden. Das restliche Reaktionsprodukt wurde 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Von der Sonde wurden 45 µl zu 22,5 ml vorgewärmtem DIG-Easy Hybridisierungspuffer (Roche) gegeben und das Gemisch entweder sofort für die Hybridisierung verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung der *gfp*-spezifischen Sonde für die Analyse der *gfp* Reporterlinien (siehe Kapitel 3.1.1) wurden die Primer GH GFP F1 und GH GFP R2 verwendet (siehe Tab. 2). Die Hybridisierungstemperatur für diese Sonde wurde wie im nächsten Kapitel beschrieben berechnet und betrug 50 °C.

2.2.12.4 DNA Hybridisierung

Die trockene Membran wurde mit der DNA Seite nach innen in eine vorgewärmte Glasröhre gelegt und für die Vorhybridisierung mit vorgewärmten DIG-Easy Hybridisierungspuffer überschichtet. Im Hybridisierungs-ofen (Duo-Therm-Ofen OV5, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) wurde die Röhre mit der Membran für 2-4 h bei entsprechender Hybridisierungstemperatur rotierend inkubiert. Die Hybridisierungstemperatur wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$T_m = 49,82 + 0,41 \times \% \text{ GC-Gehalt} - 600/\text{Hybridlänge}$$

$$T_{\text{opt}} = T_m - (20-25 \text{ °C}) \rightarrow \text{der Mittelwert entspricht der Hybridisierungstemperatur}$$

Nach der Vorhybridisierung wurde der Hybridisierungspuffer gegen eine DIG-markierte Sonde ausgetauscht und über Nacht bei konstanter Rotation und entsprechender Temperatur hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst zweimal für 5 min mit 2x SSC Puffer + 0,1 % (w/v) SDS bei RT rotierend gewaschen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. In einem zweiten Schritt wurde zweimal für 15 min 0,1x SSC Puffer + 0,1 % (w/v) SDS verwendet und die Membran in der Hybridisierungsröhre bei 68 °C rotierend gewaschen.

2.2.12.5 Nachweis spezifischer DNA Sequenzen

Die Detektion der Sonde wurde mit Hilfe des DIG Wash and Block Buffer Sets (Roche, Mannheim, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die zuletzt im Detektionspuffer

inkubierte Membran wurde in eine saubere, zugeschnittene Klarsichtfolie gelegt und 2 ml CSPD *ready to use* (Roche) gleichmäßig darauf verteilt. Die Folie wurde geschlossen und Luftblasen mit Küchenpapier vorsichtig entfernt. Nach 5 min wurde überschüssige Flüssigkeit ausgestrichen, die Folie mit einem Schweißgerät versiegelt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Der Chemilumineszenzfilm (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) wurde im Dunkeln auf die Membran gelegt und für 1-2 h belichtet. Danach erfolgten die Entwicklung des Films sowie die Fixierung.

2.2.13 Enzymatische Restriktion

Alle Restriktionen mit einem oder zwei Restriktionsenzymen wurden, falls nicht anders angegeben, bei 37 °C für mindestens 30 min durchgeführt. Dabei wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet und die Enzymaktivität danach entsprechend den Zeit- und Temperaturangaben inaktiviert.

2.2.14 Dephosphorylierung

Um nach der Restriktion die Religation des Vektors zu vermeiden, wurde an den Enden der Fragmente eine Dephosphorylierung durchgeführt. Dafür wurde 1 µl Alkaline Phosphatase (1U/µl; Promega, Mannheim, Deutschland) zu dem Restriktionsansatz hinzugefügt und das Gemisch für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte bei 75 °C für 10 min.

2.2.15 Elution von DNA aus Agarosegel

Die Extraktion und Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Das DNA Fragment mit der erwarteten Größe wurde mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und dann nach den Angaben des Herstellers eluiert. Die eluierte DNA wurde zeitnah für die Ligation verwendet.

2.2.16 DNA Ligation

Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte in Abhängigkeit der Größe und Konzentration des Inserts in einem molaren Verhältnis zwischen 1:3 und 1:7. Für die Ligrationsreaktion wurde die T4 DNA Ligase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet. Alle Komponenten wurden in einem 10 µl Ligrationsansatz für 2 h bei RT oder ÜN bei 4 °C inkubiert:

Vektor	20-100 ng	
Insert	1:3 – 1:7	(molares Verhältnis Vektor:Insert)
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	1 µl	
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	1 µl	
H ₂ O	bis 10 µl	

2.2.17 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

2.2.17.1 *Escherichia coli*

Für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden 3 µl Ligationsansatz mit 50 µl Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C, gefolgt von einer Inkubation von 2 min auf Eis. 450 µl steriles SOC-Medium wurden zu dem DNA-Bakterien-Gemisch zugegeben und die transformierten Zellen für 60 min bei 37 °C und 550 rpm geschüttelt. Danach wurden 50-100 µl der transformierten Zellen mit Hilfe eines sterilen Drigalskispatels auf Petrischalen mit LB-Medium und entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Holzzahnstocher aufgenommen und in flüssiges LB-Medium (inklusive Antibiotikum) überführt. Über Nacht wurden die Zellen bei 37 °C und 180 rpm vermehrt.

2.2.17.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Zunächst wurden aus einer *A. tumefaciens* Suspension mittels Dreiösenausstrich Kolonien vereinzelt und anschließend eine Einzelkolonie in 10 ml YEB-Medium (mit Rifampicin und Ampicillin) ÜN bei 28 °C und 180 rpm angezogen. Von dieser Übernachtskultur wurden 5 ml in 200 ml pures YEB-Medium überführt (Start OD₆₀₀ ~0,04) und die Kultur solange bei 28 °C (180 rpm) angezogen, bis ein OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Anschließend wurde die Flüssigkultur in 50 ml Reaktionsgefäßen für 20 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in eiskaltes 10 mM Tris (steril filtriert) aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet in 2 ml antibiotikafreiem, eiskaltem YEB-Medium gelöst und anschließend 50 µl Aliquotes angefertigt (in 2ml Reaktionsgefäßen), welche in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurden.

Chemisch kompetente *A. tumefaciens* Zellen (GV2260, 50 µl) und 10 µl pDNA wurden gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit den Zellen kurz in flüssigen Stickstoff gehalten und dann für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach diesem Hitzeschock wurden 600 µl steriles YEB-Medium zugegeben und die transformierten Zellen für 5-6 h bei 28 °C und 300 rpm geschüttelt. Mit Hilfe eines Drigalskispatels wurden 100-200 µl der Zellen auf Petrischalen mit YEB-Medium und den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und für zwei Tage im Dunkeln bei 28 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden mittels eines Holzzahnstochers aufgenommen, in flüssiges YEB-Medium (inklusive Antibiotika) überführt und ÜN bei 28 °C und 180 rpm vermehrt.

2.2.18 Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurden einzelne Kolonien von *E. coli* unter Verwendung eines sterilen Holzzahnstochers von der Platte abgestrichen und in ein PCR-Reaktionsgefäß gebracht. Jeweils 20 µl des PCR-Reaktionsgemisches wurden zugegeben und die PCR gestartet (siehe Kapitel 2.2.5).

2.2.19 Extraktion von Plasmid DNA

Die Extraktion von pDNA aus transformierten *E. coli* oder *A. tumefaciens* Zellen erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN (Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Die Bakterien wurden dafür wie in Kapitel 2.2.17.1 und 2.2.17.2 beschrieben ÜN angezogen. Die in 30 µl Puffer eluierte pDNA wurde bei 4 °C bzw. bei -20 °C für längere Zeit gelagert.

Um eine höhere Konzentration der pDNA für die Verwendung im Partikelbeschuss (Kapitel 2.2.21) zu erhalten, wurde das QIAprep Spin Midiprep Kit (QIAGEN) verwendet und den Angaben des Herstellers gefolgt. Für diese Extraktion wurde 1 ml einer *E. coli* Startkultur in 100 ml LB Medium überimpft und ÜN bei 37 °C und 180 rpm angezogen.

2.2.20 Photometrische Quantifizierung von Bakterienkulturen

Die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen wurde mit dem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers bei 600 nm durchgeführt. Für die Messung wurden 1:10 Verdünnungen verwendet und der gemessene Wert anschließend mit dem Faktor 10 multipliziert, um die unverdünnte OD₆₀₀ zu erhalten.

2.2.21 Transiente Transgenexpression von *N. benthamiana* und *N. tabacum* durch Partikelbeschuss

Für die Transformation durch Partikelbeschuss (auch bekannt unter Biolistik) wurden die jüngsten, voll entwickelten Blätter von 6-8 Wochen alten *N. benthamiana* oder 4 Wochen alten *N. tabacum* Pflanzen (Anzucht im Gewächshaus) auf MS-Medium mit 1 M Saccharose gelegt und anschließend mit einem DNA-Gold-Gemisch beschossen. Hierfür wurden 50 µl Goldsuspension (Ø 0,1 µm, BIO-RAD, München, Deutschland) aus der Stammlösung entnommen (30 mg Goldpartikel in 1 ml 100 %igem Ethanol) und dreimal mit je 100 µl ddH₂O gewaschen. Unter leichtem Schütteln wurde die pDNA hinzugefügt und gut mit den Goldpartikeln gemischt. Sollten mehrere Konstrukte gleichzeitig transferiert werden, wurden die verschiedenen pDNAs zuvor gemischt und dann zu den Goldpartikeln pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Spermidin (0,1 mol/l) und 25 µl CaCl₂ (2,5 mol/l); der Ansatz wurde 3 min lang gut geschüttelt, danach zentrifugiert und das DNA-Gold-Pellet zweimal mit Ethanol (75 % (v/v), 100 %) gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet in 60 µl Ethanol (reinst, 100 %) gelöst.

Vor dem Beschuss wurden die biolistischen *Macrocarrier* sowie die Berstscheiben (BIO-RAD, München, Deutschland) in Ethanol gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Das PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System von BIO-RAD wurde verwendet, um die DNA bei einem Vakuum von 27 Inch und einem Druck von 1100 psi in die Blattunterseite zu schießen. Für den Beschuss wurde der Hepta-Adapter des Systems verwendet und je 4 µl des DNA-Gold-Gemisches pro *Macrocarrier* verwendet. Ein Blatt wurde jeweils zweimal beschossen (die Platte wurde vor dem zweiten Schuss um 90° gedreht), anschließend für 24 h bei RT inkubiert und am nächsten Tag wurde

der Beschuss mit dem Lichtmikroskop Axio Imager M2 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) ausgewertet.

Die Ergebnisse der transienten Co-Expression von einem Testvektors mit spezifizierten Endonukleasen (siehe Kapitel 3.1.2) wurden mit dem konfokalen Lasermikroskop LSM780 (Carl Zeiss) als Bilddatei festgehalten. Die Visualisierung der YFP Fluoreszenz erfolgte mit einer 514 nm Laserlinie in Kombination mit einem 517-560 nm Bandpassfilter; die mCherry Fluoreszenz wurde mit einer 561 nm Laserlinie in Kombination mit einem 570-620 nm Bandpassfilter visualisiert.

2.2.22 Stabile Transgenexpression von *N. benthamiana* und *N. tabacum* mittels Agrobakterien

Für die stabile Transformation von Tabak wurden die jüngsten, voll entwickelten Blätter von 6-8 Wochen alten Gewächshaus-Pflanzen oberflächensterilisiert, indem sie kurz in 70 %igen (v/v) Ethanol und danach für 5-7 min in Natriumhypochlorit-Lösung (0,6 % (v/v) mit einem Tropfen Tween) geschwenkt wurden. Nach mehrmaligem Spülen mit sterilem ddH₂O, wurden die Blätter in etwa 1 cm² große Stücke geschnitten, auf Tabakmedium ohne Antibiotika gelegt und für ein bis zwei Tage bei RT im Dunkeln vorkultiviert. Transformierte Agrobakterien wurden etwa 20 h vor der Co-Kultur in 10 ml YEB-Medium mit Rif/Amp/Spec angeimpft und bei 28 °C und 180 rpm geschüttelt. Eine Agrobakteriensuspension mit einer OD₆₀₀ von 0,2 wurde hergestellt und die Blattstücke darin für 30 min inokuliert. Anschließend wurden die Stücke auf sterilem Filterpapier abgetupft, zurück auf die Ausgangspetrischale gelegt und für drei Tage bei 19 °C im Dunkeln co-kultiviert. Die Blattstücke wurden anschließend auf Tabakmedium mit Antibiotika (je nach Konstrukt entweder 100 mg/l Kanamycin, 5 mg/l Bialaphos oder 30 mg/l Hygromycin) gebracht und alle zehn Tage auf neues Medium übertragen. Die Kultivierung fand bei 23-24 °C und im Dunkeln statt, bis sich erste Regenerationen an den gebildeten Kallussen gezeigt haben. Danach wurden die Petrischalen mit den Blattstücken ins Licht gestellt. Regenerierte Explantate wurden dann auf MS-Medium umgesetzt und später die entwickelten Sprosse in Plastikboxen überführt, um ein gutes Wachstum zu gewährleisten. Sprosse, die Wurzeln ausgebildet hatten, wurden ins Gewächshaus gebracht. Zunächst wurden sie in kleinen Töpfen (Ø 6 cm) mit Anzuchterde (Substrat 1, Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) bei 22/20 °C und einer 16 h Photoperiode mit 35.000 Lux kultiviert. Nach 3-4 Wochen wurden sie umgetopft (Topf Ø 14 cm, Substrat 2, Klasmann-Deilmann GmbH) und bei 20/18 °C, 16 h Photoperiode, 30.000 Lux weiter angezogen.

2.2.23 Vegetative Erhaltung von Blattexplantaten

Für die vegetative Erhaltung von Pflanzen mit induzierten Mutationen, wurden Explantate von verschiedenen Blättern oberflächensterilisiert, wobei sie zunächst kurz in 70 %igen (v/v) Ethanol und anschließend für 5-7 min in 0,6 %iger (w/v) Natriumhypochlorit-Lösung geschwenkt wurden. Danach wurden die Explantate dreimal mit sterilem ddH₂O gewaschen, in ~1 cm² große Stücke geschnitten

und auf MS Medium gelegt. Die Regeneration erfolgte wie im vorherigen Kapitel für transgenes Material beschrieben, entweder ohne Selektion oder anhand von 5 mg/l Bialaphos im Medium (für die Selektion der gRNA/Cas9 T-DNA).

2.2.24 Embryogene Pollenkultur von *N. tabacum*

Die embryogene Pollenkultur von *N. tabacum* wurde wie in (Floss *et al.* 2009) beschrieben durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurden geschlossene Blütenknospen sterilisiert, die Antheren herausgequetscht und mit Isolierungslösung in einen *Waring Blender* (Eberbach, Ann Arbor, MI, USA) transferiert, um das Material zu homogenisieren und die unreifen Pollenkörner freizusetzen. Nachdem das Homogenisat filtriert wurde, wurden die Pollenkörner mehrmals mit Isolierungslösung gewaschen und die Anzahl mit Hilfe eines Hämozytometers ermittelt. Die Lösung mit ~500 000 Pollenkörnern/ml wurde zunächst zur Auslösung embryogener Entwicklung für eine Woche bei 32 °C und nach dem Wechsel in Nährmedium für weitere drei Wochen bei 25 °C inkubiert. Die entwickelten embryogenen Strukturen wurden auf festem Regenerationsmedium verteilt, um Spross- und Wurzelwachstum zu ermöglichen. Bewurzelte Pflänzchen wurden anschließend ins Gewächshaus überführt. Die Selektion der Regenerate erfolgte anhand von 5 mg/l Bialaphos in den verwendeten Nährmedien.

2.2.25 Ploidiemessung

Die Ploidie der Regenerate aus der embryogenen Pollenkultur wurde bestimmt, um dihaploide Pflanzen zu identifizieren und deren reduziertes Genom durch chemische Behandlung auf den somatischen Chromosomensatz zu reduplizieren und somit Fertilität und die Bildung von Saatgut zu gewährleisten. Für die Messung wurden 2 ml Wasser in einem 15 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und auf Eis gestellt. Von ausgewählten regenerierten Pflanzen wurde je ein Blattstück abgeschnitten und in ein Röhrchen überführt. Für die Kalibrierung dienten gleichaltrige *N. tabacum* WT Pflanzen. Jede Blattprobe wurde in eine Petrischale mit 2,9 ml CyStain® UV Ploidie Puffer (Partec, Görlitz, Deutschland) gelegt und anschließend mit einer feinen Drahtbürste mehrfach über das Blattstück gerieben, um eine Zellsuspension zu gewinnen. Diese wurde anschließend über einen Filter (Cell Trics® Filter 30 µm, Partec) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung auf Eis und im Dunkeln gelagert. Der verwendete CyStain® UV Ploidie Puffer enthält den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, mit dem die DNA markiert und dadurch die Messung der Ploidie mit dem CyFlow® Ploidy Analyser (Partec) nach den Angaben des Herstellers ermöglicht wurde.

2.2.26 Colchizinierung haploider Pflanzen

Regenerierte Pflanzen aus einer embryogenen Pollenkultur befinden sich entweder im haploiden oder doppelhaploiden Zustand. Da es sich bei *N. tabacum* um eine allotetraploide Art handelt spricht man bei den Regeneraten die einen Chromosomensatz von $1n = 2x$ haben von dihaploiden Pflanzen.

Regenerierte dihaploide Pflanzen deren Saatgut für weitere Untersuchungen verwendet werden sollte, wurden mit einer 0,1 %igen (w/v) Colchizinlösung behandelt, um eine Genomverdopplung und damit die Bildung von Saatgut zu erreichen. Die Colchizinlösung wurde am Tag der Behandlung frisch hergestellt, indem die abgewogene Menge in 800 µl DMSO gelöst und dann mit Wasser aufgefüllt sowie 2-3 Tropfen Tween 20 hinzugefügt wurden. Je nach Größe der zu behandelnden Pflanze wurden 5-10 ml Colchizinlösung benötigt. Vor der Behandlung wurden alle Blätter sowie der Großteil der Wurzel abgeschnitten und der restliche Wurzelballen gründlich in Wasser gewaschen, um Medienreste zu entfernen. Anschließend wurde der übrig gebliebene Teil der Pflanze in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit Colchizinlösung gegeben, sodass die Wurzel und 1-2 mm des Sprosses vollständig von dieser bedeckt waren. Die Proben wurden bei 22 °C für sechs Stunden ins Licht gestellt, wobei eine Verdunstung der Lösung durch Abdecken der Reaktionsgefäße mit Klarsichtfolie vermieden wurde. Nach der Inkubation wurden die Wurzeln mehrmals in Wasser gewaschen, abgetupft und anschließend getopft (Ø 6 cm, Substrat 1, Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland). Die Kultivierung der behandelten Pflanzen erfolgte zunächst bei 22/20 °C und einer 16 h Photoperiode mit 35.000 Lux. Nach 3-4 Wochen wurden die Pflanzen umgetopft und weiter bei 20/18 °C, 16 h Photoperiode, 30.000 Lux angezogen.

2.2.27 Kreuzen von *N. benthamiana* bzw. *N. tabacum* Pflanzen

Als Vorbereitung auf die Kreuzung wurden die Pflanzen, die als weiblicher Elter dienten, zunächst emaskuliert, indem die Blüten seitlich geöffnet und die noch unreifen Antheren mit Hilfe einer Pinzette entfernt wurden. Die *N. benthamiana* Blüten wurden anschließend mit einem kleinen, leichten Plastikröhrchen abgedeckt, um Fremdbestäubung zu verhindern, während die größeren Blüten von *N. tabacum* mit einer Plastiktüte geschützt wurden. Ein bis maximal drei Tage nach der Emaskulation wurde die Narbe mit dem Pollen des Kreuzungspartners per Hand bestäubt und die Blüte danach wieder abgedeckt. Nach erfolgreicher Bestäubung konnten die Kapseln mit den reifen Samen nach 46 Wochen geerntet, aufgearbeitet und weiter verwendet werden.

2.2.28 Konfokale Mikroskopie

Die GFP Fluoreszenz wurde in Blättern von ausgewählten homozygoten *gfp* Mutanten und *N. tabacum* WT Pflanzen mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM780 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) detektiert. Die Visualisierung des GFP Signals wurde durch Anregung mit einer 488 nm Laserlinie in Kombination mit einem 491-530 nm Bandpassfilter für die Detektion durchgeführt. Um die Differenzierung von Fluoreszenzsignalen zu verbessern, wurden alle Bilder einheitlich mit der Adobe Photoshop CS Software (siehe Tab. 4) bearbeitet. Die folgenden Parameter wurden verändert: Tonwertkorrektur von 255 auf 100, die Blau- und Magentatöne wurden auf +25

erhöht und die Cyantöne auf -5 verringert; die Sättigung und die Lab-Helligkeit der Blautöne wurden auf einen Wert von -50 herabgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer TALEN Plattform für *N. tabacum* unter Verwendung von *gfp* als Zielgen

3.1.1 Herstellung und Charakterisierung einer *gfp* Reporterlinie von *N. tabacum*

Um die TALEN Plattform in *N. tabacum* zu etablieren, wurde das S65T *gfp* (in der vorliegenden Arbeit nur als *gfp* bezeichnet) Gen als Ziel ausgewählt. Der Transformationsvektor pGH292 der die *gfp* Expressionskassette enthält (siehe Kapitel 2.1.7.1) sowie die daraus entstandenen *N. tabacum* *gfp* Reporterlinien wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe hergestellt und standen somit für die Verwendung in dieser Arbeit zur Verfügung.

Für die Etablierung der TALEN Plattform war es notwendig mit einer Tabaklinie zu arbeiten, die nur eine Kopie der T-DNA integriert hatte. Aus diesem Grund wurde die Kopienanzahl der T-DNA mit Hilfe der DNA Gelblot Analyse bestimmt (siehe Kapitel 2.2.12). Von 122 untersuchten T₀ Pflanzen hatten 53 eine Kopie der T-DNA, 11 Pflanzen zwei Kopien, sieben Pflanzen drei Kopien und eine Pflanze vier Kopien in ihr Genom eingebaut (Abb. 8). Bei 50 der 122 Pflanzen konnte keine Kopie nachgewiesen werden. Von diesen Pflanzen zeigten 15 ein positives Ergebnis bei der Amplifikation von *gfp* mittels PCR, während die restlichen Pflanzen bereits in der PCR ein negatives Ergebnis erbrachten.

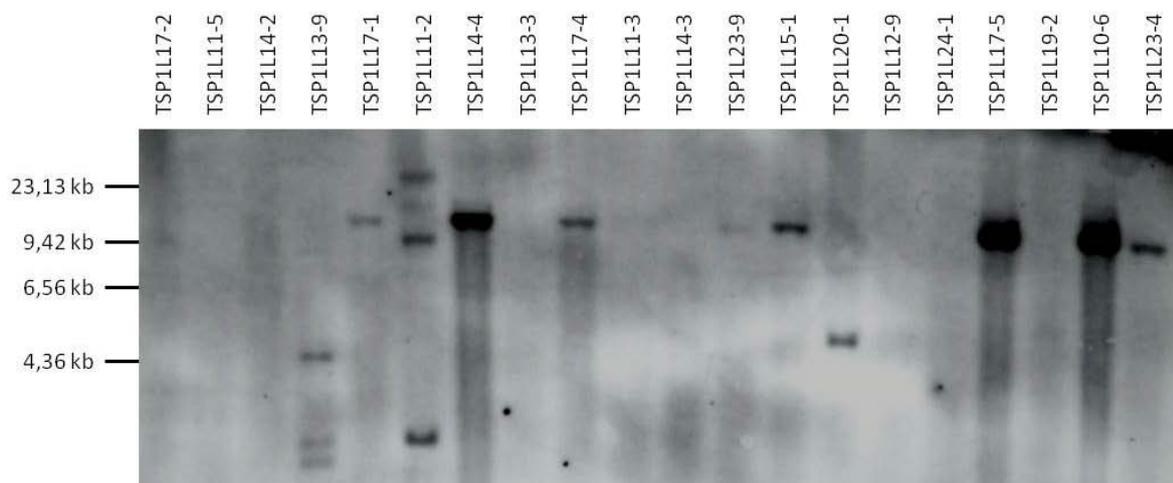


Abb. 8: DNA Gelblot Analyse von ausgewählten primär transgenen Pflanzen aus Transformationsexperimenten mit pGH292 (AtUbi10P::*gfp*). Je 20 µg genomische DNA wurden mit *SacI* verdaut und die Fragmente in 0,8 %igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Die Hybridisierung der spezifischen DNA Sequenzen erfolgte mit einer *gfp*-spezifischen Sonde. Die Größenangaben des verwendeten DIG-Marker II befinden sich auf der linken Seite; die Bezeichnungen der einzelnen Pflanzen sind oberhalb des Bildes angegeben.

Anzumerken ist, dass die Banden von einigen Pflanzen mit einer Kopie der T-DNA, wie z.B. #TSP1L14-4, #TSP1L17-4 oder #TSP1L15-1, die gleiche Größe aufwiesen (Abb. 8), obwohl diese Pflanzen aus unterschiedlichen Transformationsexperimenten stammten; es handelte sich hier also nicht um Geschwisterpflanzen. Eine mögliche Erklärung dafür wären Agrobakterien, die noch in den

Pflanzen vorhanden waren und zur Extraktion von deren pDNA des Transformationsvektors pGH292 führten. Der Verdau dieses Plasmids mit dem verwendeten Restriktionsenzym *SacI* führt zur Linearisierung und daraus folgend zu einheitlichen Banden mit einer Größe von etwa 11,5 kb. Sehr starke Banden, wie z.B. bei den Proben #TSP1L17-5 und #TSP1L10-6, können neben mehreren in Tandemorientierung integrierten T-DNAs auch auf in besonders hoher Abundanz persistierende Agrobakterien zurückzuführen sein. Ein Auftragen von ungleichmäßig viel μg DNA ist hingegen unwahrscheinlich, da die DNA Konzentration von jeder Probe vor dem Verdau gemessen und entsprechend eingestellt wurde.

Anschließend wurde die Segregation der T-DNA von fünf T_0 Pflanzen untersucht, wobei die Pflanzen #TSP1L9-2, #TSP1L20-1 und #TSP1L21-2 nur eine Kopie der T-DNA trugen, #TSP1L10-1 drei Kopien und #TSP1L4-1 keine Kopie. Um das Resultat der DNA Gelblot Analyse der T_0 Pflanzen zu bestätigen und eventuell falsch-negative Ergebnisse oder Fälle von Banden aufgrund persistierender Agrobakterien auszuschließen, wurde die genomische DNA von jeweils vier T_1 Pflanzen mit *SpeI* verdaut. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls mit der *gfp*-spezifischen Sonde. Bei allen Nachkommen der Pflanzen #TSP1L4-1 und #TSP1L21-2 war keine T-DNA nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigten die Nachkommen der Pflanze #TSP1L10-1 unterschiedliche Kopienanzahlen sowie verschiedene Integrationsloci (Abb. 9). Bei zwei Nachkommen von T_0 Pflanze #TSP1L9-2 handelte es sich entweder um eine starke Bande oder zwei Banden mit ähnlicher Größe, während die restlichen zwei Pflanzen eine dünne Bande aufwiesen. Drei der Nachkommen von Pflanze #TSP1L20-1 wiesen eine Kopie der T-DNA auf, während der vierten Pflanze keine Kopie vererbt wurde. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Pflanze #TSP1L20-1- T_1 1 ausgewählt und deren Nachkommen für die Experimente zur Etablierung der TALEN Plattform verwendet.

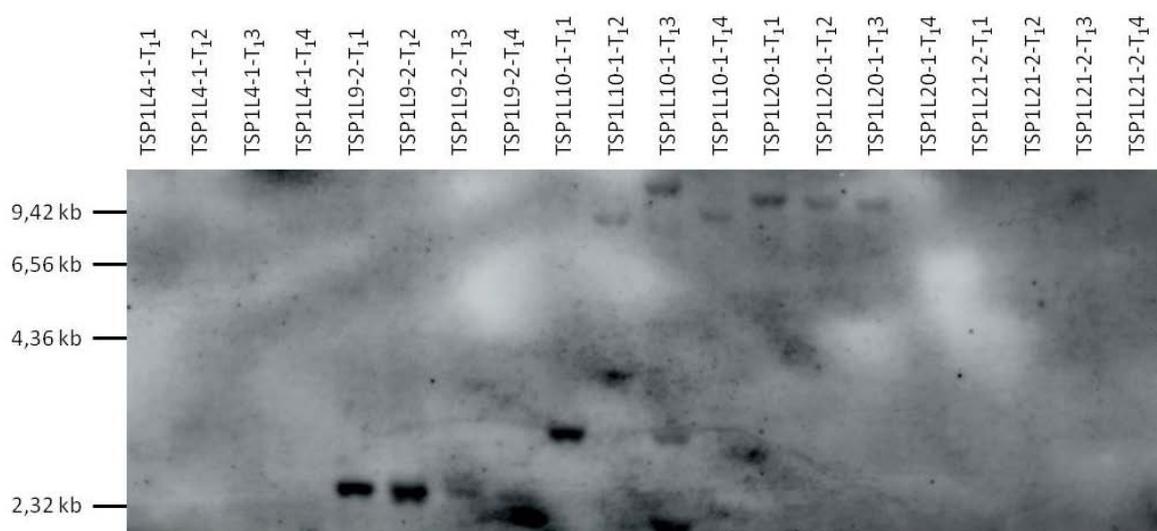


Abb. 9: DNA Gelblot Analyse von T_1 Individuen der T_0 Pflanzen #TSP1L4-1, #TSP1L9-2, #TSP1L10-1, #TSP1L20-1 und #TSP1L21-2 (*AtUbi10P::gfp*). Je 20 μg genomische DNA wurden mit *SpeI* verdaut und die Fragmente in 0,8 %igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Die Hybridisierung der spezifischen DNA Sequenzen erfolgte mit einer *gfp*-spezifischen Sonde. Die Größenangaben des verwendeten DIG-Marker II befinden sich auf der linken Seite; die Bezeichnung der einzelnen Pflanzen ist oberhalb des Bildes angegeben.

3.1.2 Klonierung *gfp*-spezifischer TALENs

Die Zielsequenzen der beiden *gfp*-spezifischen TALEN-Einheiten befinden sich in der Mitte des *gfp* in dessen größtem *Loop* (siehe Abb. 4 und Abb. 10). Nach der Assemblierung der TALENs durch die Firma Collectis Bioresearch (Paris, Frankreich) wurden diese wie in Kapitel 2.1.7.2 beschrieben zur Klonierung der Transformationsvektoren verwendet. Der detaillierte Aufbau der resultierenden Vektoren pSP10 (TALEN-R) und pSP11 (TALEN-L) ist in Abb. 6 dargestellt. Sowohl die Auswahl der Zielsequenzen als auch die Klonierung der TALEN Vektoren erfolgte zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe, sodass diese Vektoren für die Verwendung in der vorliegenden Arbeit bereits zur Verfügung standen.

```

~ 17 bp ~      ~ 12 bp ~      ~ 17 bp ~
5' -ATG ~356 bp~ GGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTTCAAGGAGGACGGCAACA ~327 bp~ -3'
3' -      ~356 bp~ CCACTTGGCGTAGCTCGACTTCCCGTAGCTGAAGTTCCTCCTGCCGTTGT ~327 bp~ -5'

```

Abb. 10: Zielsequenzen der spezifischen TALEN-Einheiten im *gfp* in doppelsträngiger Darstellung Die blau markierte Sequenz repräsentiert die 17 bp lange Sequenz der linken TALEN-Einheit, die in grün die der rechten. Der *Spacer* zwischen den beiden TALEN-Einheiten beträgt 12 bp. Das Startcodon „ATG“ ist dunkelrot hervorgehoben.

3.1.3 Validierung *gfp*-spezifischer TALENs mittels transienter Co-Expression mit einem Testvektor

Das Prinzip zur Validierung der Funktionalität spezifizierbarer Endonukleasen beruht auf der fehlerhaften Reparatur von Endonuklease-induzierten Doppelstrangbrüchen und der daraus folgenden Generierung von Insertionen und/oder Deletionen an oder in der Nähe der Zielregion. Mittels Partikelbeschuss wird ein Testvektor, der die gewünschte Zielsequenz und ein mutiertes, nicht-funktionales *yfp* (*Yellow Fluorescent Protein*) Reportergen enthält, in die untere Blattepidermis übertragen. Durch das Co-Bombardement mit einer Zielsequenz-spezifischen Endonuklease (in diesem Fall die *gfp*-spezifischen TALENs) werden Mutationen erzeugt, von denen ein gewisser Anteil die Funktionalität des *yfp* Gens stromabwärts der Zielregion (in Richtung 3'-Ende) wiederherstellt (Abb. 11). Für die Validierung wird eine konstitutive *mCherry* Expressionskassette (Kapitel 2.1.7.4) verwendet und das Verhältnis von rot und gelb fluoreszierenden Zellen berechnet, um so die Effizienz der entsprechenden Endonuklease zu bestimmen.

Wie in Kapitel 2.2.21 beschrieben, wurde die Unterseite von *N. tabacum* WT Blättern mit einem DNA-Goldpartikel-Gemisch beschossen und die Fluoreszenz einen Tag nach dem Beschuss detektiert. Als Testvektor diente pTARGET-gfp1 (Kapitel 2.1.7.3), welcher die Zielregion der *gfp*-spezifischen TALENs enthält. Zur Kontrolle wurde zunächst nur dieser Testvektor zusammen mit der *mCherry* Expressionskassette übertragen, um auszuschließen dass das *yfp* noch funktional ist. Bei drei unabhängigen Versuchen wurden nur rot fluoreszierende Zellen gezählt (Tab. 5) und daraufhin der Beschuss mit Testvektor, *gfp*-spezifischen TALENs (siehe Abb. 6) und *mCherry* Expressionskassette durchgeführt. Die rot und gelb fluoreszierenden Zellen (Abb. 12) wurden ausgezählt und die ermittelten Werte in Tab. 5 zusammengefasst.

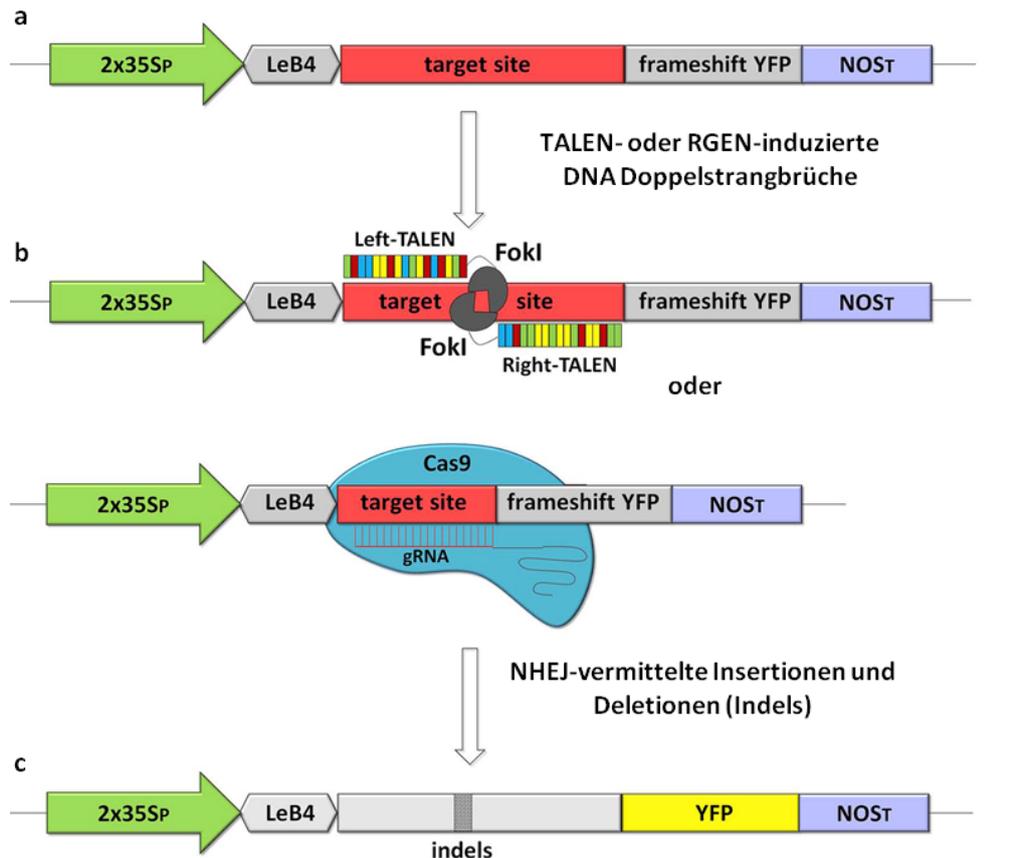


Abb. 11: Prinzip zur Validierung von spezifizierbaren Endonukleasen (verändert nach Budhagatapalli *et al.* 2016). a) Das Einbringen der Zielregion (*target site*) für Sequenz-spezifische Endonukleasen in den Testvektor führt zu einer Verschiebung des translationalen Leserahmens (*frameshift*) in der *yfp* Sequenz. b) Durch die Co-Transformation des Testvektors mit TALENs oder RGENs werden DNA Doppelstrangbrüche an oder in der Nähe der Zielregion erzeugt. c) Die fehlerhafte Reparatur dieser Brüche durch Nicht-homologe Endverknüpfung kann zur Wiederherstellung des ursprünglichen Leserahmens und somit zur Expression von *yfp* und der Emission des YFP Signals führen. Die dargestellten Elemente sind nicht im Maßstab gezeichnet. 2x35SP: doppelt verstärkter *CaMV 35S* Promoter; LeB4: *Vicia faba Legumin B4* Signalpeptid; YFP: synthetisches *Yellow Fluorescent Protein* Gen; NOST: terminale Sequenz der *NOPALIN-SYNTHASE* aus *A. tumefaciens*; FokI: DNA Spaltungseinheit der *Flavobacterium okeanokoites* Typ IIS Restriktionsendonuklease; gRNA: *guide RNA*; Cas9: *Streptococcus pyogenes* Cas9; TALEN: *Transcription Activator-Like Effector* Nuklease; RGEN: RNA-vermittelte Endonuklease; NHEJ: Nicht-homologe Endverknüpfung (*Non-Homologous End-Joining*).

Tab. 5: Effizienz der *gfp*-spezifischen TALEN Konstrukte in biolistisch transformierten Tabakblättern.

Zielgen	Art der Endonuklease	verwendete Konstrukte	Experiment	YFP Zellen	mCherry Zellen	YFP/mCherry Zellen (in %)
<i>gfp</i>	TALEN	pTARGET- <i>gfp1</i>	1	195	361	54,0
		+ <i>gfp</i> -spezifische TALENs	2	25	183	13,7
			3	80	545	14,7
			∅	100 ± 71	363 ± 148	27,5
		pTARGET- <i>gfp1</i>	1	0	106	0
			2	0	204	0
			3	0	81	0
			∅	0	130 ± 65	0

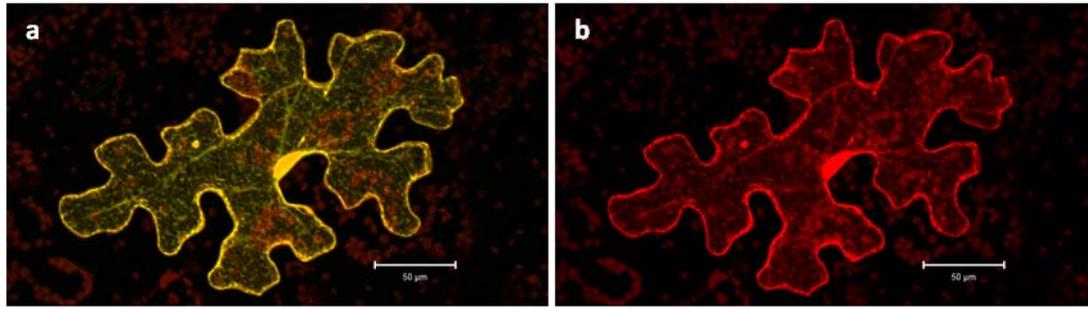


Abb. 12: *yfp* Expression nach TALEN-induzierten Mutationen. Repräsentative Epifluoreszenz in einer transgenen Zelle ein Tag nach dem Partikelbeschuss von *N. tabacum* Blättern mit *gfp*-spezifischen Test- und TALEN Vektoren. *mCherry* wurde zur Normalisierung des Beschusses co-bombardiert. a) YFP Fluoreszenz, b) mCherry Fluoreszenz; Balken 50 µm.

3.1.4 Re-Transformation der *gfp* Reporterlinie mit *gfp*-spezifischen TALENs

Mit Hilfe der DNA Gelblot Analyse wurde nachgewiesen, dass die Linie TSP1L20-1-T₁1 nur eine Kopie der *gfp* Expressionskassette integriert hatte. Aus diesem Grund wurde diese Linie ausgewählt und deren Nachkommen für die Re-Transformationsexperimente mit den *gfp*-spezifischen TALEN Konstrukten verwendet. Die TALEN Vektoren wurden entweder einzeln oder zusammen (in einem Verhältnis von 1:1) durch Agrobakterien-vermittelte Transformation transferiert. Pro Variante, das heißt für pSP10 (TALEN-R) oder pSP11 (TALEN-L; siehe Abb. 6) alleine oder beide TALEN-Einheiten zusammen, wurden insgesamt 135 Blattsegmente transformiert. Während der Anfangsphase der Regeneration trat eine starke Kontamination auf, wodurch die meisten Blattsegmente verloren gingen und nur wenige Pflanzen regeneriert werden konnten (siehe Tab. 6). Blattmaterial von den Regeneraten wurde verwendet um genomische DNA zu extrahieren und anschließend PCRs mit verschiedenen Primerpaar-Kombinationen durchzuführen, um die Präsenz der beiden TALEN-Einheiten sowie des Selektionsmarkers zu untersuchen (Primer siehe Tab. 2). Die PCR-Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Zusätzlich zu der Re-Transformation der *gfp* Reporterlinie wurde *N. tabacum* WT ebenfalls mit der linken, rechten oder beiden *gfp*-spezifischen TALEN-Einheiten transformiert, um die daraus resultierenden Pflanzen für spätere Kreuzungsversuche zu verwenden. Die Anzahl der regenerierten Pflanzen aus den verschiedenen Experimenten sowie die PCR-Ergebnisse dieser sind ebenfalls in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR hinsichtlich der Präsenz der *gfp*-spezifischen TALENs und des Selektionsmarkers.

Donormaterial	verwendete Konstrukte	Anz. Blatt-segmente	Anz. regenerierter Pflanzen	Anz. Pflanzen mit linker TALEN-Einheit	Anz. Pflanzen mit rechter TALEN-Einheit	Anz. Pflanzen mit beiden TALEN-Einheiten
<i>gfp</i> Reporterlinie	pSP10 (TALEN-R)	14	9	-	9	-
	pSP11 (TALEN-L)	34	3	3	-	-
	pSP10 und pSP11	36	10	5	5	0
<i>N. tabacum</i> Wildtyp	pSP10 (TALEN-R)	50	5	-	5	-
	pSP11 (TALEN-L)	64	4	4	-	-
	pSP10 und pSP11	66	15	10	5	0

3.1.5 Analyse der *gfp* Zielregion regenerierter Pflanzen

Sowohl bei der Re-Transformation der *gfp* Reporterlinie mit beiden TALEN-Einheiten als auch bei der Co-Transformation von WT Material, konnten keine Pflanzen regeneriert werden, die beide TALEN-Einheiten enthielten (siehe Tab. 6). In Gerste wurde jedoch gezeigt, dass die Integration beider TALEN-Einheiten nicht dringend notwendig ist, um eine Mutation in der Zielregion zu erzeugen (Gurushidze *et al.* 2014). Eine transiente Expression der beiden Einheiten reichte dafür aus. Die Integration von mindestens einer der TALEN-Einheiten mit gekoppeltem Selektionsmarkergen ist jedoch erforderlich, um Pflanzen unter selektiven Bedingungen regenerieren zu können. Orientierend an den Ergebnissen dieser Publikation wurde, unter Verwendung der Primer GH GFP F1 und GH GFP R2 (siehe Tab. 2), ein 561 bp großes Fragment von *gfp* amplifiziert und sequenziert. Die *gfp* Zielregion von zehn regenerierten Pflanzen aus den Re-Transformationsexperimenten mit beiden TALEN-Einheiten und der *gfp* Reporterlinie als Donormaterial wurde untersucht. In keiner der Pflanzen konnte jedoch eine Mutation im *gfp* festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).

3.1.6 Kreuzung von Pflanzen mit je einer der *gfp*-spezifischen TALEN-Einheiten

Da keine Pflanzen regeneriert werden konnten, die beide TALEN-Einheiten stabil integriert hatten, wurde der Versuch unternommen primär transgene Pflanzen zu kreuzen und deren Nachkommen hinsichtlich Präsenz beider Einheiten und induzierter Mutationen im *gfp* zu untersuchen. Dafür wurden zehn T₀ Pflanzen ausgesucht die entweder *gfp* und linke TALEN-Einheit, *gfp* und rechte TALEN-Einheit oder nur die linke oder rechte TALEN-Einheit (im WT Hintergrund) enthielten. Insgesamt sieben Kreuzungskombinationen wurden durchgeführt. Abhängig davon wie viel reifer Pollen zur Verfügung stand, wurden auch die reziproken Kreuzungen realisiert. Die entsprechenden Kreuzungspartner sind Tab. 7 zu entnehmen. Pro Pflanze wurden jeweils vier Blüten an unterschiedlichen Tagen bestäubt (siehe Kapitel 2.2.27) und nach vier bis sechs Wochen die reifen Samen geerntet.

Tab. 7: Übersicht der Kreuzungspartner mit *gfp*-spezifischen TALEN-Einheiten.

Kreuzung Nr.	weiblich		x		männlich
I	WT mit TALEN R	#226	x	#224	<i>gfp</i> mit TALEN L
II	<i>gfp</i> mit TALEN L	#216	x	#226	WT mit TALEN R
III	WT mit TALEN R	#231	x	#224	<i>gfp</i> mit TALEN L
IV	<i>gfp</i> mit TALEN L	#224	x	#231	WT mit TALEN R
V	WT mit TALEN L	#227	x	#217	<i>gfp</i> mit TALEN R
VI	<i>gfp</i> mit TALEN R	#215	x	#227	WT mit TALEN L
VII	WT mit TALEN L	#228	x	#220	<i>gfp</i> mit TALEN R
VIII	<i>gfp</i> mit TALEN R	#220	x	#228	WT mit TALEN L
IX	WT mit TALEN L	#230	x	#217	<i>gfp</i> mit TALEN R
X	<i>gfp</i> mit TALEN R	#217	x	#230	WT mit TALEN L

3.1.7 Analyse der *gfp* Zielregion in Kreuzungsnachkommen

Von den durchgeführten Kreuzungen wurden fünf ausgewählt (Kreuzungen Nr. II, IV, VI, VII, X) und je 11-30 Nachkommen hinsichtlich der Präsenz der TALEN-Einheiten (Primerpaar: GH Ubi10 F1 und TALEN R1, siehe Tab. 2) überprüft (Abb. 13a). Von insgesamt 101 untersuchten Pflanzen konnten in 35 beide *gfp*-spezifischen TALEN-Einheiten nachgewiesen werden (siehe Tab. 8). Von Nachkommen mit beiden TALEN-Einheiten wurde die *gfp* Zielregion amplifiziert und für ein T7 Endonuklease 1 (T7E1) Assay verwendet (siehe Kapitel 2.2.8). Dazu wurde das aufgereinigte 561 bp große *gfp* Amplifikat denaturiert und wieder hybridisiert, um die Bildung eines sogenannten Heteroduplexes in den Proben zu ermöglichen, wo mehrere *gfp* Varianten vorhanden waren. Heteroduplexe werden von der T7E1 erkannt und geschnitten (Mashal *et al.* 1995), wodurch zwei etwa gleich große Fragmente entstehen, wenn kleine Indels in oder nahe der Zielregion vorhanden sind. Diese beiden Fragmente sind nach der Gelelektrophorese mit 1,5 %iger (w/v) Agarose als eine Bande sichtbar. Lediglich eine von 35 Pflanzen war T7E1 positiv, während die restlichen ein negatives Ergebnis zeigten (Abb. 13b), was einer Mutationseffizienz von 2,86 % entspricht. Um falsch-negative Ergebnisse des T7E1 Assays auszuschließen, wurden die *gfp* Amplifikate von ausgewählten Pflanzen, wie z.B. #IV-5 oder #X-7 (siehe Abb. 13b), direkt sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse bestätigten in diesem Fall jedoch das Resultat des T7E1 Assays. Von der positiven Pflanze #X-9 wurden subklonierte, einzelne *gfp* Amplifikate sequenziert und eine 36 bp große Deletion identifiziert (Abb. 13c). Neben diesem mutierten *gfp* Allel wurde in Pflanze #X-9 auch das *gfp* WT Allel detektiert.

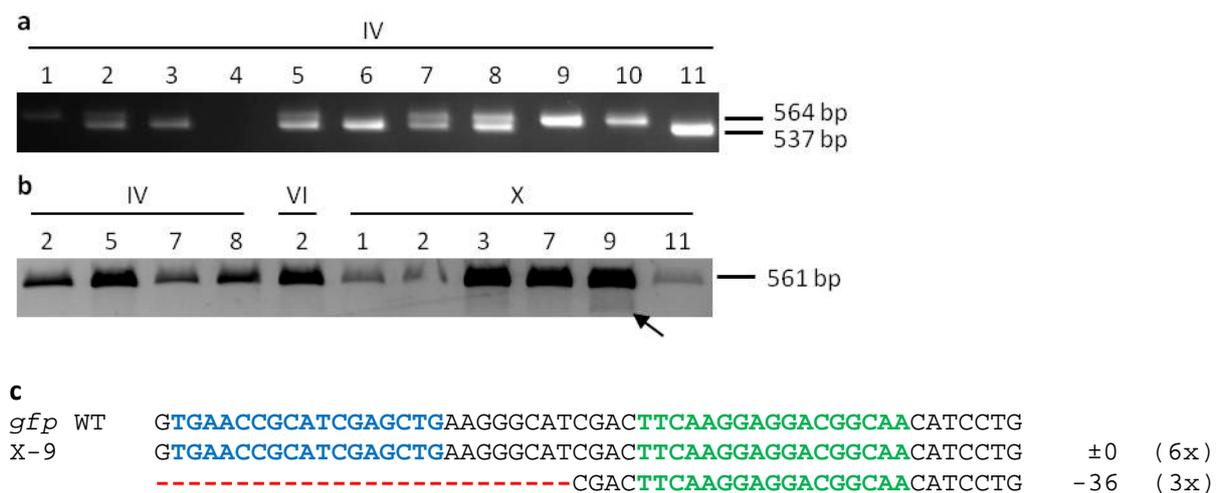


Abb. 13: Analyse von Kreuzungsnachkommen *gfp*-spezifischer TALEN Pflanzen. a) Nachweis der *gfp*-spezifischen TALEN-Einheiten in ausgewählten Kreuzungsnachkommen von Kreuzung Nummer IV mittels PCR. Die erwarteten Produkte lagen bei 564 bp für die linke und 537 bp für die rechte Einheit. Die Verwendung von 1,5 %igen (w/v) Agarosegelen erlaubte die Unterscheidung der beiden Einheiten. b) Ergebnis des T7E1 Assays für ausgewählte Pflanzen der Kreuzungen Nummer IV, VI und X. Bei vorhandener Mutation im *gfp* ist nach der elektrophoretischen Auftrennung eine zweite, in diesem Fall jedoch sehr schwache Bande zu sehen (mit einem Pfeil markiert). c) Sequenzierungsergebnisse einzelner *gfp* Amplifikate der Pflanze #X-9. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die Sequenz der linken TALEN-Einheit, die in grün die der rechten. Deletionen sind mit roten Bindestrichen hervorgehoben und die Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) sowie die Anzahl an Kolonien mit der entsprechenden *gfp* Sequenz befinden sich auf der rechten Seite der Sequenzen.

Tab. 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR hinsichtlich der Präsenz der *gfp*-spezifischen TALENs und des T7E1 Assays zur Identifizierung von Pflanzen mit *gfp* Mutation.

Kreuzung Nr.	Anzahl untersuchter Pflanzen	Anzahl Pflanzen ohne TALEN-Einheiten	Anzahl Pflanzen mit linker TALEN-Einheit	Anzahl Pflanzen mit rechter TALEN-Einheit	Anzahl Pflanzen mit beiden TALEN-Einheiten	Anzahl Pflanzen mit <i>gfp</i> Mutation
II	30	5	3	1	21	0
IV	11	3	3	1	4	0
VI	15	1	9	2	3	0
VIII	30	21	0	9	0	0
X	15	4	1	3	7	1
gesamt	101	34	16	16	35	1

3.1.8 Analyse der Nachkommen von Mutante #X-9

Um die Vererbung der *gfp* Mutation von Pflanze #X-9 zu untersuchen, wurde von 50 Nachkommen genomische DNA extrahiert, die *gfp* Zielregion amplifiziert und das aufgereinigte Produkt für den T7E1 Assay verwendet. Bei zehn von 50 Nachkommen konnte kein *gfp* Amplifikat erzeugt werden (siehe Anhang Tab. A 2); es handelte sich hier um F₂ Individuen, denen das *gfp* Gen nicht vererbt wurde. Von den restlichen 40 Nachkommen hatten zwei (5,0 %) je eine *gfp* Mutation genetisch fixiert (Abb. 14), während 36 der Nachkommen (90,0 %) nur das *gfp* WT Allel trugen. Die PCR-Produkte der verbliebenen zwei Pflanzen (5,0 %) wurden subkloniert und einzelne Klone sequenziert. Dabei konnten weitere Mutationen identifiziert werden, bei denen es sich um eine 1 bp Deletion bzw. Insertion handelte. Die maternale 36 bp Deletion konnte nicht wiedergefunden werden.

F₁ Generation

```

gfp WT   GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTG
X-9      GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTG   ±0
          -----CGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTG   -36

```

F₂ Generation

```

X-9-04   GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTG   ±0
          GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTG   +1
X-9-11   GTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-----GACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTG   -5*
X-9-22   GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTG   ±0
          GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC-TCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTG   -1
X-9-43   GTGAACCGCATCGAG-----TTCAGGAGGACGGCAAATCCTG   -15*

```

Abb. 14: Vererbung der TALEN-induzierten *gfp* Mutation von Pflanze #X-9. Im oberen Teil der Abbildung ist das Sequenzierungsergebnis von subklonierten *gfp* Amplifikaten der Mutterpflanze #X-9 dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Ergebnisse der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten oder einzelner, subklonierter *gfp* Amplifikate ausgewählter Nachkommen. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die Sequenz der linken TALEN-Einheit, die in grün die der rechten. Deletionen sind mit roten Bindestrichen und Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen. Homozygot mutierte Pflanzen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

Die Präsenz der rechten TALEN-Einheit wurde in 27 von 50 untersuchten Nachkommen und die der linken in 20 Pflanzen mittels PCR nachgewiesen. In drei Individuen konnte keine der beiden TALEN-Einheiten gefunden werden (Anhang Tab. A 2). In diesen drei Pflanzen konnte ebenfalls keine *FokI* amplifiziert werden, während bei den restlichen Pflanzen ein PCR-Produkt vorhanden war. Unter

den transgenfreien Pflanzen befand sich eine heterozygote Mutante (#X-9-22), während die verbliebenen zwei Pflanzen die *gfp* WT Sequenz genetisch fixiert hatten. Da in der Mutante #X-9-22 keine TALEN-Einheit vorhanden war, muss die 1 bp Deletion trotz zunächst ausgebliebener Detektion bereits in der Mutterpflanze #X-9 induziert und daraufhin vererbt worden sein.

3.1.9 Vegetative Erhaltung der TALEN-induzierten *gfp* Mutation von Pflanze #X-9

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, konnte die maternale 36 bp große Deletion der Pflanze #X-9 nicht unter den 40 untersuchten Nachkommen wiedergefunden werden. Es wurde deshalb der Versuch unternommen diese Mutation vegetativ zu erhalten, indem Blattstücke von der Mutterpflanze *in vitro* kultiviert und daraus Pflanzen regeneriert wurden (siehe Kapitel 2.2.23). Die *gfp* Zielregion von 18 erzeugten Regeneraten wurde amplifiziert und für den T7E1 Assay verwendet. Von den untersuchten Pflanzen zeigte eine ein positives Ergebnis im Assay, während die restlichen T7E1 negativ waren. Unter den T7E1 negativen fanden sich nur homozygote *gfp* WT Pflanzen. Das *gfp* Amplifikat der T7E1 positiven Pflanze wurde subkloniert und einzelne Klone sequenziert, wodurch zwei Mutationen identifiziert werden konnten. Es handelte sich dabei um eine 1 bp und eine 15 bp Deletion (Abb. 15). Die *gfp* WT Sequenz wurde in dieser Pflanze ebenfalls detektiert. Die maternale 36 bp Deletion konnte nicht wiedergefunden werden.

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA	CATCCTG	
X-9	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA	CATCCTG	±0
	-----CGACTTCAAGGAGGACGGCAA	CATCCTG	-36
Vegetative Erhaltung			
X-9-SC03	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA	CATCCTG	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA	CATCCTG	-1
	GTGAACC-----GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA	CATCCTG	-15

Abb. 15: Sequenzierungsergebnisse von Regeneraten der Mutante #X-9 aus der vegetativen Erhaltung. Die Sequenzierungsergebnisse von subklonierten *gfp* Amplifikaten der Donorpflanze #X-9 sind im oberen Teil der Abbildung gezeigt; im unteren Teil sind die Ergebnisse des somatischen Klons dargestellt. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die Sequenz der linken TALEN-Einheit, die in grün die der rechten. Deletionen sind mit roten Bindestrichen hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen.

Mittels PCR wurde die Präsenz der TALEN-Einheiten untersucht (GH Ubi10 F1/TALEN R1, siehe Tab. 2). Dabei zeigte sich, dass in sieben Regeneraten keine der beiden Einheiten vorhanden war, während die restlichen 11 Pflanzen die linke TALEN-Einheit beherbergten. Die rechte TALEN-Einheit wurde in keinem Regenerat gefunden (Anhang Tab. A 3). Die Präsenz von nur einer TALEN-Einheit in der Mutante #X-9-SC03 weist darauf hin, dass zur Entstehung dieser Pflanze mehr als eine Zelle der chimären Mutterpflanze #X-9 beigetragen haben muss, da drei verschiedene Allele (inklusive des Wildtyps) detektiert wurden.

3.2 Erzeugung von *CENH3* Mutationen in *N. benthamiana* mittels TALEN Plattform

3.2.1 Partielle Komplementierung von *N. benthamiana* mit verschiedenen *CENH3*-Derivaten

3.2.1.1 Klonierung der *CENH3*-Derivate NbH3-tailswap und At*CENH3*-tailswap

Der prinzipielle Aufbau beider *CENH3*-Derivate umfasst den Promoter des nativen *CENH3* Gens aus *N. benthamiana*, ein *gfp* Gen und die Histonfaltungsdomäne des nativen *NbCENH3s*. Der N-Terminus des nativen *NbCENH3* wurde entweder durch die N-terminale Sequenz des kanonischen Histons H3 aus *N. benthamiana* (siehe Abb. 16a) oder durch den N-Terminus des *CENH3* aus *A. thaliana* (siehe Abb. 16b) ausgetauscht. Die Klonierung der beiden Transformationsvektoren pSI11 (NbH3-tailswap) und pSI15 (At*CENH3*-tailswap) erfolgte wie in Kapitel 2.1.7.5 beschrieben. Die entstandenen Transformationsvektoren enthalten die in Abb. 16 dargestellten Komponenten.

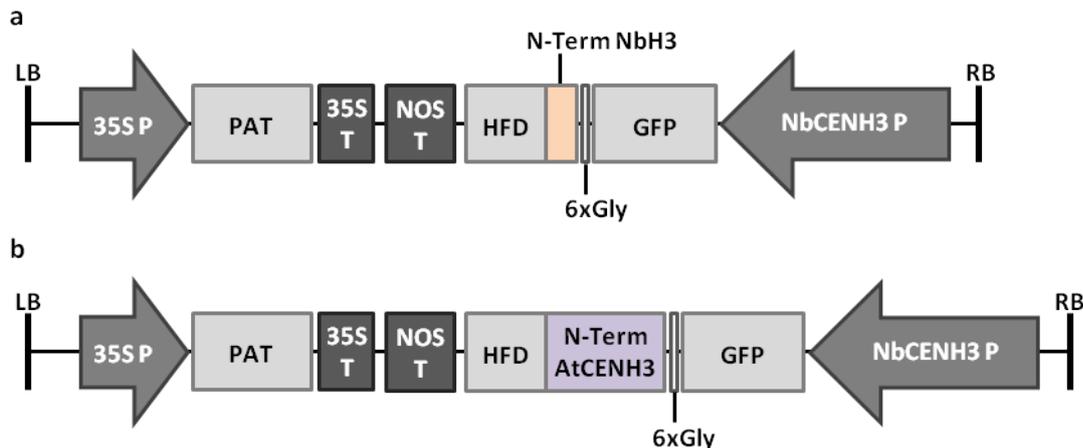


Abb. 16: Schematische Darstellung der *CENH3*-Derivate zur partiellen Komplementierung. a) NbH3-tailswap Konstrukt pSI11 und b) At*CENH3*-tailswap Konstrukt pSI15. LB: linke Abgrenzung der T-DNA (*Left Border*); RB: rechte Abgrenzung der T-DNA (*Right Border*); 35S P: Promotersequenz des *CaMV 35S*; *PAT*: *PHOSPHINOTHRICIN-ACETYLTRANSFERASE* Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* (vermittelt Resistenz gegenüber Bialaphos); 35S T: terminale Sequenz des *CaMV 35S*; NOS T: terminale Sequenz des *NOPALIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*; HFD: Histonfaltungsdomäne des *CENH3* Gens aus *N. benthamiana*; N-Term NbH3: N-terminale Sequenz des kanonischen Histons H3 aus *N. benthamiana*; 6xGly: Glycin-Linker bestehend aus sechsmal Glycin; GFP: synthetisches Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (*Green Fluorescent Protein*); NbCENH3 P: Promotersequenz des *CENH3* Gens aus *N. benthamiana*; N-Term At*CENH3*: N-terminale Sequenz des *CENH3* Gens aus *A. thaliana*.

3.2.1.2 Transformation von *N. benthamiana* mit *CENH3*-Derivaten

Die beiden *CENH3*-Derivate wurden mittels Agrobakterien in *N. benthamiana* WT Pflanzen transferiert, um zum einen die Lokalisierung der Konstrukte in stabil transgenen Pflanzen zu untersuchen und zum anderen, um diese Pflanzen für nachfolgende Kreuzungen zu verwenden. Es wurden zwei Transformationsexperimente für das NbH3-tailswap Konstrukt und drei Experimente für At*CENH3*-tailswap durchgeführt. Es wurden 15 Pflanzen aus den Transformationen mit dem NbH3-tailswap regeneriert, von denen 12 das Komplementationskonstrukt beherbergten. Der Nachweis der T-DNA erfolgte durch PCRs mit genspezifischen Primern für *PAT*, *gfp* und die N-terminale Region des

Derivates (siehe Tab. 2). Bei den AtCENH3-tailswap Transformationen regenerierten lediglich zwei Pflanzen, von denen beide das Komplementationskonstrukt enthielten.

3.2.1.3 Lokalisierung der CENH3-Derivate in stabil transgenen Pflanzen

Um die Lokalisierung der klonierten und transformierten CENH3-Derivate zu bestimmen, wurde Blattmaterial von ausgewählten primär transgenen Pflanzen mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops LSM780 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Hierbei wurde nach der Fluoreszenz von GFP geschaut, welches jeweils an den N-Terminus der Derivate fusioniert wurde. Vier Pflanzen von den 12 primär transgenen Pflanzen mit dem NbH3-tailswap wurden untersucht und zeigten alle, dass das Konstrukt in den Zellkern transportiert wurde und sich dort an den Zentromeren anlagerte (Abb. 17a-d). Bei den Pflanzen aus den Transformationen mit dem AtCENH3-tailswap, konnte ebenfalls eine Zellkernlokalisierung festgestellt werden (Abb. 17e, f).

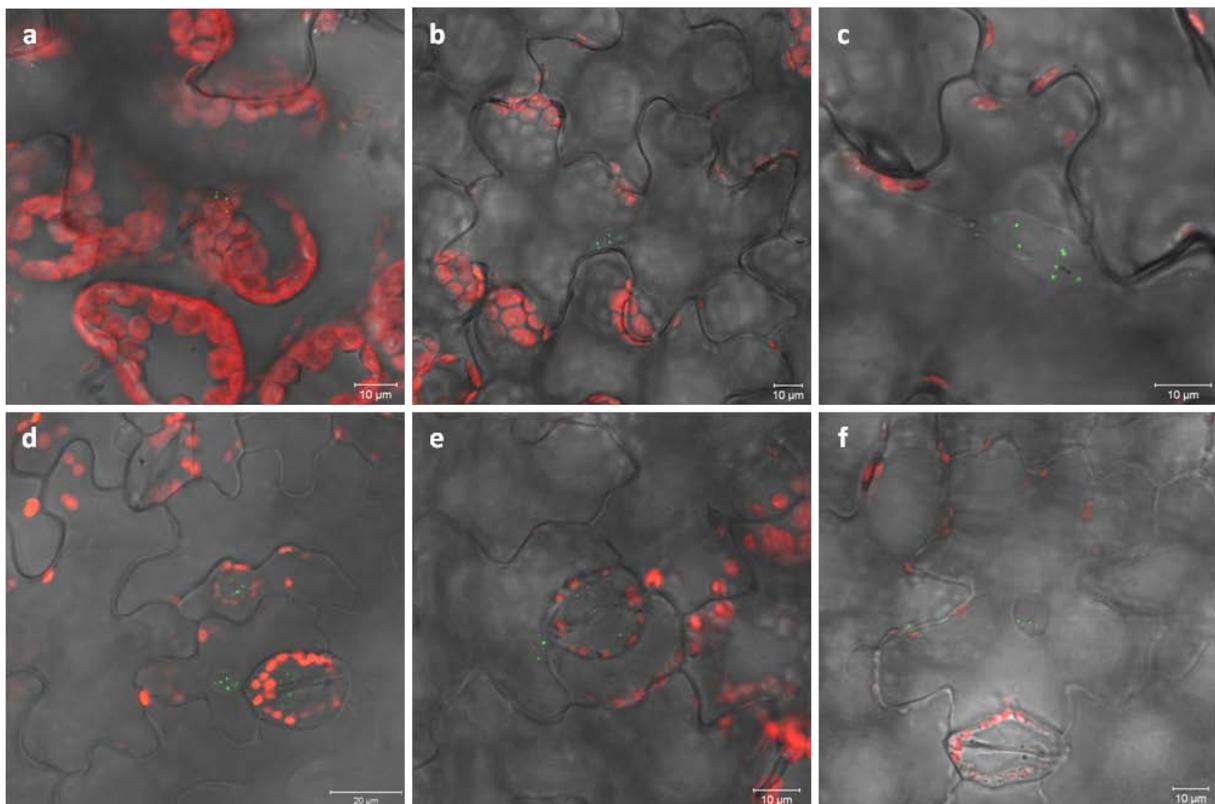


Abb. 17: GFP Fluoreszenz in ausgewählten Pflanzen mit CENH3-Derivaten. a-d) Primär transgene Pflanzen Nummer #2, #3, #4 und #13 mit NbH3-tailswap Konstrukt, e, f) regenerierte Pflanzen Nummer #30 und #39 mit AtCENH3-tailswap Konstrukt; Balken 10 µm außer bei d) 20 µm.

3.2.2 Klonierung *NbCENH3*-spezifischer TALEN Konstrukte

N. benthamiana ist eine allotetraploide Art mit zwei elterlichen diploiden Chromosomensätzen ungeklärten Ursprungs. Es ist davon auszugehen, dass viele Gene in zweifacher Ausführung vorliegen, aber durch die Reduktion der Chromosomenanzahl ($2n = 4x = 38$) auch einige Genkopien verloren gingen. Das Abgleichen der *CENH3* Sequenzen von *N. tabacum* mit denen des vorläufigen Referenz-Genoms von *N. benthamiana* (https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_benthamiana/genome)

führte zu zwei Resultaten; bezeichnet als *NbCENH3-1* und *NbCENH3-2*. Bei dem Versuch diese beiden Sequenzen aus der genomischen DNA von *N. benthamiana* WT Pflanzen zu amplifizieren, konnte lediglich die *NbCENH3-1* Sequenz vollständig vervielfältigt werden, während bei der *NbCENH3-2* Sequenz nur die ersten drei Exons einschließlich Introns amplifiziert werden konnten. Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurden die *NbCENH3*-spezifischen Endonuklease-Konstrukte nur für die erste Kopie ausgewählt, da nicht sicher ist, ob *NbCENH3-2* noch zur Translation eines funktionalen Proteins führt. Das *NbCENH3-1* (in der vorliegenden Arbeit als *NbCENH3* bezeichnet) Gen hat eine Gesamtlänge von 5982 bp und ist in sieben Exons und sechs Introns gegliedert.

Das erste Exon des *CENH3* aus *N. benthamiana* wurde ausgewählt, um dort mittels TALENs Mutationen zu erzeugen. Bei der Auswahl der Zielsequenzen für die rechte und linke TALEN-Einheit wurde darauf geachtet, dass diese sich durch mehrere Nukleotidpolymorphismen von den für die *CENH3*-Derivate verwendeten N-terminalen Sequenzen unterscheiden, damit ein Knock-out dieser verhindert wird (Abb. 18).

```

                ~ 17 bp ~           ~ 13 bp ~           ~ 17 bp ~
NbCENH3  5'-ATGGCGAGAACCAAACACCTAGCCCTACGCAAACAAAGTCGCCACCAAGTCGCCCCACA-3'
NbH3     5'-ATGGC-----TCGTACG-AAACAAACT-GCCCGTAAA-----3'
          ***** * ***** * ***** **

NbCENH3  5'-ATGGCGAGAACCAAACACCTAGCCCTACGCAA---ACAAAGTCGCCACCAAGTCG-----3'
AtCENH3  5'-ATGGCGAGAACCAAGCATC--GCGTTAC-CAGGTCACAACCTCGGA-ATCAAACGTGATGC-3'
          ***** ** * ** *** ** ***** *** * ** *
```

Abb. 18: Alignment der Zielsequenzen der *NbCENH3*-spezifischen TALENs mit dem jeweiligen N-Terminus der beiden Komplementationskonstrukte. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die 17 bp lange Sequenz der linken TALEN-Einheit, die in grün der rechten (*Spacer*: 13 bp). Das Startcodon „ATG“ ist dunkelrot hervorgehoben. Asteriske repräsentieren die Übereinstimmungen der beiden Sequenzen; Bindestriche zeigen fehlende Nukleotide im Vergleich zur jeweils anderen Sequenz an.

Die Assemblierung der TALEN-codierenden Einheiten erfolgte durch die Firma Collectis Bioresearch (Paris, Frankreich), wobei eine modifizierte Version von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs3 als Grundgerüst diente. Der N-Terminus der beiden TALEN-Einheiten enthielt bereits das Kernlokalisierungssignal (vom Simianvirus S40) und jeweils einen spezifischen *Tag* für die immunologische Detektion. Die rechte Einheit hatte ein 15 Aminosäuren langes Peptid der RNase A als *Tag* (*S-Tag*), während in der linken Einheit ein Hämagglutinin-*Tag* vorhanden war. Eine erste Evaluierung des TALEN-Paares erfolgte durch die Firma selbst mit Hilfe eines *Single Strand Annealing* Assays in Hefe. In diesem Assay wies das *NbCENH3*-spezifische TALEN-Paar eine gute Spaltungsaktivität auf. Die beiden TALEN-Einheiten wurden anschließend wie in Kapitel 2.1.7.6 beschrieben kloniert, um die Transformationsvektoren pSI18 (TALEN-L) und pSI19 (TALEN-R) herzustellen. Der detaillierte Aufbau der TALEN Vektoren ist Abb. 19 zu entnehmen.

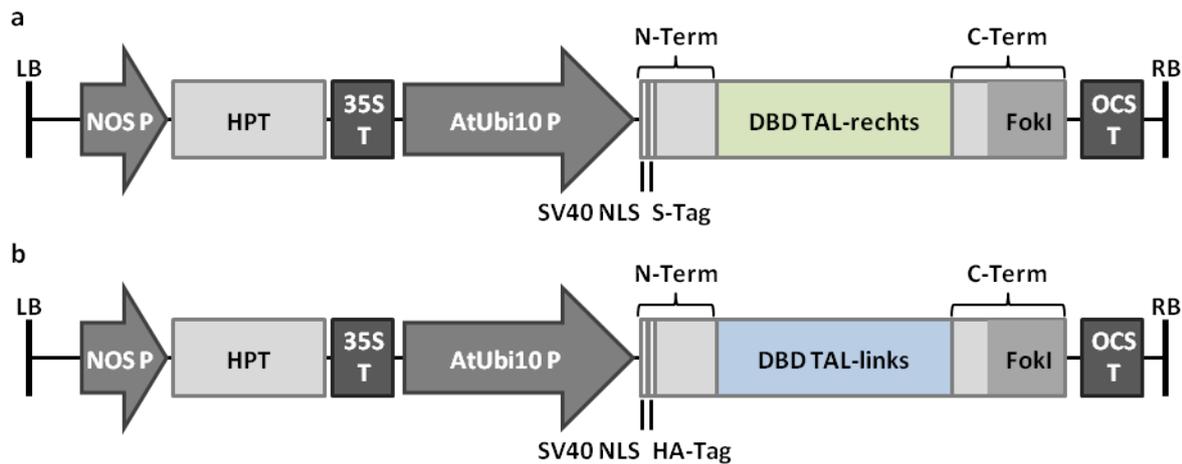


Abb. 19: Schematische Darstellung der *NbCENH3*-spezifischen TALEN Vektoren pSI18 und pSI19. Die beiden Vektoren wurden verwendet, um Mutationen im *CENH3* in *N. benthamiana* zu erzeugen. a) Aufbau des rechten TALEN Vektors (pSI19) mit SV40 NLS und S-Tag. b) Aufbau des linken TALEN Vektors (pSI18) mit SV40 NLS und HA-Tag. LB: linke Abgrenzung der T-DNA (Left Border); RB: rechte Abgrenzung der T-DNA (Right Border); NOS P: Promotersequenz des *NOPALIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*; HPT: *HYGROMYCIN-PHOSPHOTRANSFERASE* Gen aus *E. coli* (vermittelt Resistenz gegenüber Hygromycin); 35S T: terminale Sequenz des *CaMV 35S*; AtUbi10 P: *UBIQUITIN-10* Promoter von *A. thaliana*; N-Term, C-Term: N-Terminus bzw. C-Terminus des TALE Proteins AvrBs3 aus *X. campestris* pv. *vesicatoria*; SV40 NLS: Kernlokalisierungssignal von Simianvirus S40; S-Tag: 15 Aminosäuren langes Peptid der RNase A; HA-Tag: Hämagglutinin-Tag; DBD TAL-rechts/-links: DNA Bindedomäne der rechten bzw. linken TALEN-Einheit; FokI: DNA Spaltungsdomäne aus *Flavobacterium okeanokoites* Typ IIS Restriktionsendonuklease; OCS T: terminale Sequenz des *OCTOPIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*.

3.2.3 Validierung *NbCENH3*-spezifischer TALENs mittels transienter Co-Expression mit einem Testvektor

Die transiente Co-Expression der *NbCENH3*-spezifischen TALENs mit einem Testvektor wurde ebenfalls verwendet, um die Effizienz der TALENs zu validieren. Zur Herstellung des Sequenz-spezifischen Testvektors wurden die entsprechenden Oligonukleotide (siehe Tab. 3), welche Überhänge für die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI/*Eco*RI hatten, in den Vektor pNB1 (GenBank: KU705395) ligiert. Als Kontrolle für die Nicht-Funktionalität des YFP wurde dieser Vektor, pTARGET-CENH3 1, nur in Kombination mit dem mCherry Vektor in die Unterseite eines *N. benthamiana* WT Blattes geschossen. Die Auswertung des Partikelbeschusses ergab 350 rot und keine gelb fluoreszierenden Zellen. Der Testvektor wurde daraufhin für die Validierung der TALENs verwendet und zusammen mit diesen und der *mCherry* Expressionskassette in Blattunterseiten geschossen. Das Ergebnis der Auszählungen von drei unabhängigen Experimenten ist in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Effizienz der *NbCENH3*-spezifischen TALEN Konstrukte in biolistisch transformierten Tabakblättern.

Zielgen	Art der Endonuklease	verwendete Konstrukte	Experiment	YFP Zellen	mCherry Zellen	YFP/mCherry Zellen (in %)
<i>NbCENH3</i> Exon1	TALEN	pTARGET-CENH3 1	1	31	364	8,5
		+ <i>NbCENH3</i> -spezifische TALENs	2	1	83	1,2
			3	0	410	0
		∅		11 ± 14	285 ± 145	3,0
		pTARGET-CENH3 1	1	0	350	0

3.2.4 Transformation von *N. benthamiana* mit *NbCENH3*-spezifischen TALENs

N. benthamiana WT Pflanzen wurden mit der linken oder rechten TALEN-Einheit transformiert, um Pflanzen für nachfolgende Kreuzungen zu erhalten. Hierfür wurden je TALEN-Einheit zwei Transformationsexperimente durchgeführt und die Pflanzen mit 30 mg/l Hygromycin selektiert. Für die linke TALEN-Einheit (pSI18) wurden 63 Blattstücke mit den entsprechend transformierten Agrobakterien co-kultiviert und daraus 14 Pflanzen regeneriert, die alle die TALEN-Einheit beinhalteten (Nachweis durch PCR mit verschiedenen Primerpaaren; siehe Tab. 2). Im Gegensatz dazu konnten aus 73 Blattstücken nur sechs Pflanzen regeneriert werden, von denen fünf die rechte TALEN-Einheit (pSI19) enthielten.

3.2.5 Co-Transformation von *N. benthamiana* mit Komplementationskonstrukten und *NbCENH3*-spezifischen TALENs

3.2.5.1 Co-Transformation von *N. benthamiana* mit einem CENH3-Derivat und einer TALEN-Einheit

Eines der beiden CENH3-Derivate (*NbH3*- oder *AtCENH3*-tailswap) wurde entweder mit der linken oder rechten TALEN-Einheit co-transformiert. Dafür wurde die optische Dichte der jeweiligen Agrobakterienstämme auf den gleichen Wert eingestellt und die Bakterien vor der Inokulation im Verhältnis von 1:1 gemischt. Es wurden für jede Kombination jeweils zwei Transformationsexperimente durchgeführt und die Pflanzen mit Bialaphos (zur Selektion der CENH3-Derivate) und/oder Hygromycin (zur Selektion der TALENs) selektiert. Aus den beiden Transformationsexperimenten mit *NbH3*-tailswap und linker TALEN-Einheit konnte keine Pflanze regeneriert werden, während bei der Kombination von *NbH3*-tailswap und rechter TALEN-Einheit eine Pflanze entstand, die nur die TALEN-Einheit enthielt; die Selektion dieser Pflanze erfolgte mittels Hygromycin (siehe Tab. 10).

Die Transformation von insgesamt 111 Blattstücken mit dem *AtCENH3*-tailswap Konstrukt und der linken TALEN-Einheit führte zur Regeneration von neun Pflanzen. Bei der Co-Transformation mit *AtCENH3*-tailswap und rechter TALEN-Einheit konnten fünf Pflanzen aus 89 Blattstücken regeneriert werden. Bei keinem Transformationsexperiment mit doppelter Selektion (Bialaphos und Hygromycin) wurde eine Pflanze regeneriert. PCRs mit verschiedenen genspezifischen Primerpaaren (siehe Tab. 2) wurden durchgeführt, um nachzuweisen welche T-DNA Sequenzen in den Pflanzen vorhanden waren. Die Ergebnisse der PCRs sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Übersicht der PCR-Ergebnisse regenerierter Pflanzen aus den Co-Transformationsexperimenten mit Komplementationskonstrukten und einer *NbCENH3*-spezifischen TALEN-Einheit.

Bezeichnung Pflanze	PCR-Ergebnisse							verwendetes Selektionsagens
	<i>HPT</i>	TALEN-L	TALEN-R	<i>PAT</i>	<i>gfp</i>	NbH3-ts	AtCENH3-ts	
Co-Transformation NbH3-ts mit rechter TALEN-Einheit								
#64	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
Co-Transformation AtCENH3-ts mit linker TALEN-Einheit								
#28	+	+	-	-	-	-	-	Hygromycin
#47	+	+	-	+	+	-	+	Bialaphos
#65	+	+	-	+	+	-	+	Bialaphos
#66	+	+	-	+	+	-	+	Bialaphos
#77	-	-	-	+	+	-	+	Bialaphos
#78	+	+	-	+	+	-	+	Hygromycin
#83	+	+	-	+	+	-	+	Bialaphos
#84	+	-	-	+	+	-	+	Bialaphos
#85	+	+	-	+	+	-	+	Hygromycin
Co-Transformation AtCENH3-ts mit rechter TALEN-Einheit								
#29	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#36	-	-	-	+	+	-	+	Bialaphos
#50	+	-	+	+	+	-	+	Bialaphos
#79	-	-	-	+	+	-	+	Bialaphos
#80	-	-	-	+	+	-	+	Bialaphos

3.2.5.2 Co-Transformation von *N. benthamiana* mit einem CENH3-Derivat und beiden TALEN-Einheiten

Bei diesen Experimenten wurde das NbH3- oder AtCENH3-tailswap Konstrukt mit beiden TALEN-Einheiten co-transformiert, wobei die Agrobakterien in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt wurden. Für die Transformation von NbH3-tailswap und *NbCENH3*-spezifischen TALENs wurden insgesamt 333 Blattstücke (von sechs Experimenten) mit den Agrobakterien co-kultiviert. Daraus konnten 16 Pflanzen regeneriert werden. Bei der Co-Transformation von AtCENH3-tailswap mit den beiden TALEN Konstrukten regenerierten aus 247 Blattstücken (ebenfalls von sechs Experimenten) 11 Pflanzen. Die Transformationsexperimente mit Doppelsektion (Bialaphos und Hygromycin) führten nicht zur Regeneration von Pflanzen. Um die integrierten T-DNA Sequenzen in den Regeneraten nachzuweisen, wurden PCRs mit mehreren genspezifischen Primerpaaren (siehe Tab. 2) durchgeführt und die Ergebnisse in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Übersicht der PCR-Ergebnisse regenerierter Pflanzen aus den Co-Transformationsexperimenten mit Komplementationskonstrukt und beiden *NbCENH3*-spezifischen TALEN-Einheiten.

Bezeichnung Pflanze	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR	verwendetes Selektionsagens
	<i>HPT</i>	TALEN-L	TALEN-R	<i>PAT</i>	<i>gfp</i>	NbH3-ts	AtCENH3-ts	
Co-Transformation NbH3-ts mit beiden TALEN-Einheiten								
#37	+	+	+	-	-	-	-	Hygromycin
#45	+	+	+	-	-	-	-	Hygromycin
#51	+	+	+	-	-	-	-	Hygromycin
#52	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#53	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#54	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#59	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#60	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#61	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#67	+	+	+	+	+	+	-	Bialaphos

Bezeichnung Pflanze	PCR HPT	PCR TALEN-L	PCR TALEN-R	PCR PAT	PCR gfp	PCR NbH3-ts	PCR AtCENH3-ts	verwendetes Selektionsagens
#68	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#69	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#81	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#82	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#86	+	+	+	+	+	+	-	Bialaphos
#87	+	-	+	+	+	+	-	Bialaphos
Co-Transformation AtCENH3-ts mit beiden TALEN-Einheiten								
#26	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#27	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#38	+	-	+	+	+	-	+	Bialaphos
#46	-	-	-	+	+	-	+	Bialaphos
#55	-	-	-	+	+	-	+	Bialaphos
#56	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#57	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#58	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#71	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#72	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin
#73	+	-	+	-	-	-	-	Hygromycin

3.2.6 Analyse der *NbCENH3* Zielregion in regenerierten Pflanzen

Die *NbCENH3* Zielregion von ausgewählten primär transgenen Pflanzen aus den Co-Transformationsexperimenten mit beiden TALEN-Einheiten wurde amplifiziert, aufgereinigt und das PCR-Produkt direkt sequenziert, um mutierte Pflanzen zu identifizieren. Aus der Transformation mit dem NbH3-tailswap Konstrukt wurden 12 von den 16 regenerierten Pflanzen untersucht, darunter befanden sich auch vier Pflanzen in denen beide TALEN-Einheiten nachgewiesen wurden. Von den AtCENH3-tailswap Transformationen wurden neun der 11 regenerierten Pflanzen ausgewählt. Für die Amplifikation der Zielregion wurde das Primerpaar *NbCENH3* F1/*NbCENH3* R1 verwendet (siehe Tab. 2), was zu einem 624 bp großen Fragment führte. Die direkte Sequenzierung der Amplifikate ergab, dass in allen 21 untersuchten Pflanzen nur die *NbCENH3* WT Sequenz und keine Mutation vorhanden war (Daten nicht gezeigt).

3.2.7 Kreuzung verschiedener Pflanzen mit *NbCENH3*-spezifischen TALENs

Um mehr Pflanzen zu erhalten die sowohl die linke als auch die rechte TALEN-Einheit besitzen, wurden 35 primär transgene Pflanzen ausgewählt und miteinander gekreuzt. Die Auswahl umfasste nicht nur Pflanzen die eine der *NbCENH3*-spezifischen TALEN-Einheiten integriert hatten, sondern auch solche mit Komplementationskonstrukt. Von den primär transgenen Pflanzen, welche eine oder bereits beide TALEN-Einheiten besaßen, wurde vor der Kreuzung die Expression des *FokI* Gens nachgewiesen. Dafür wurde RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und als Matrize für die RT-PCR-Reaktion verwendet (siehe Kapitel 2.2.2 bis 2.2.5). Das Ergebnis der RT-PCR zeigte, dass alle untersuchten Pflanzen *FokI* exprimierten und somit für die Kreuzungen verwendet werden konnten (Abb. 20).

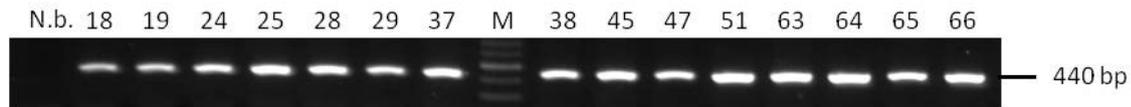


Abb. 20: Analyse von ausgewählten primär transgenen Pflanzen mit *NbCENH3*-spezifischen TALENs für Kreuzungsversuche. Nachweis der Expression des *FokI* Gens mittels RT-PCR, unter Verwendung des Primerpaares FokI F1/FokI R (PCR-Produkt: 440 bp). Als Matrize für die PCR wurde cDNA verwendet. N.b.: genomische DNA von *N. benthamiana* WT als Negativkontrolle; M: Größenstandard; 18, 19, 24, etc.: Bezeichnungen der ausgewählten T₀ Pflanzen.

Die verschiedenen Kombinationen der insgesamt 44 durchgeführten Kreuzungen (inklusive reziproke) sind im Anhang in Tab. A 4 aufgelistet. Pro Kombination wurden sechs Blüten an unterschiedlichen Tagen bestäubt, um letztendlich genügend Saatgut zu erhalten. Von insgesamt 264 bestäubten Blüten bildeten 200 Kapseln mit reifen Samen aus, wobei die Ausbeute pro Kapsel unterschiedlich ausfiel. Lediglich bei einer Kreuzung (Nr. VII) war die Bestäubung bei allen sechs Blüten erfolglos.

3.2.8 Analyse der *NbCENH3* Zielregion in Kreuzungsnachkommen

Von jeder Kreuzung wurden Samen ausgelegt und Nachkommen angezogen, um diese mittels PCR auf die Präsenz der beiden TALEN-Einheiten und der Komplementationskonstrukte zu testen. Abgesehen von vier Kreuzungen (Nr. XI, XXII, XXVII, und XXX), bei denen nur wenige Samen gekeimt sind, wurden jeweils sechs Nachkommen pro Kreuzung analysiert. Von insgesamt 239 F₁ Pflanzen hatten 66 die linke und rechte TALEN-Einheit vererbt bekommen; bei 51 der 66 F₁ Individuen konnte auch eines der beiden Komplementationskonstrukte nachgewiesen werden.

Um Mutationen im *NbCENH3* Gen zu identifizieren, wurde die Zielregion amplifiziert, aufgereinigt und die PCR-Produkte von 63 der 66 Pflanzen, die beide TALEN-Einheiten integriert hatten, direkt sequenziert. In keiner der untersuchten Pflanzen konnte eine Mutation in der *NbCENH3* Zielsequenz gefunden werden (Beispiel siehe Abb. 21), was anhand eines Doppelpeaks im Chromatogramm zu sehen gewesen wäre.

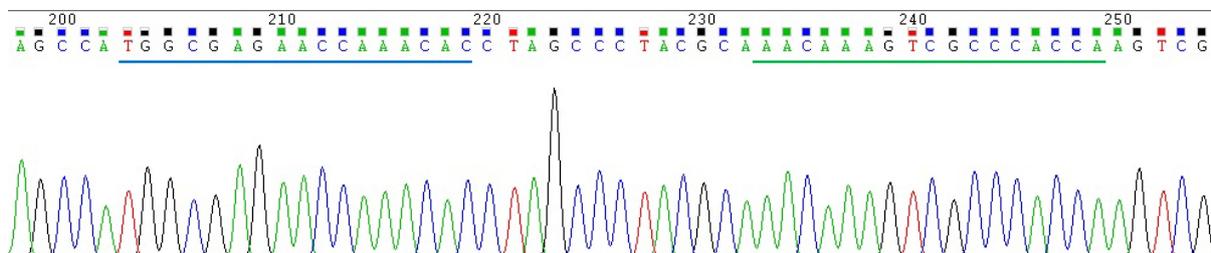


Abb. 21: Chromatogramm der Zielregion der *NbCENH3*-spezifischen TALENs von Pflanze #II-1 vertretend für alle untersuchten Pflanzen. Die Zielsequenzen der beiden TALEN-Einheiten sind unterstrichen (blau für die linke und grün für die rechte Einheit). Induzierte Mutationen würden zu einem Doppelpeak im Chromatogramm führen.

3.2.9 Analyse der *NbCENH3* Zielregion in somatischen Klonen von Kreuzungsnachkommen

In dem Versuch die Aktivität des *AtUbi10* Promoters, welcher für die Expression der TALEN-Einheiten verwendet worden ist, durch Verwundung zu steigern wurden Blattstücke von ausgewählten

Kreuzungsnachkommen kultiviert und daraus Pflanzen regeneriert (siehe Kapitel 2.2.23). Fünf Kreuzungsnachkommen die beide TALEN-Einheiten und eines der CENH3-Derivate integriert hatten, wurden ausgewählt. Es handelte sich dabei um die F₁ Pflanzen #II-1 und #XXIX-3 mit dem NbH3-tailswap Konstrukt und #XIII-2, #XVII-6 und #XXIII-5 mit dem AtCENH3-tailswap. Es konnten zwischen zwei und 21 Pflanzen pro Donorpflanze regeneriert werden, die zunächst auf die Präsenz der beiden TALEN-Einheiten getestet wurden. Von insgesamt 45 Regeneraten hatten 21 sowohl die linke als auch die rechte TALEN-Einheit integriert (siehe Anhang Tab. A 5). Von diesen Regeneraten wurde jeweils die *NbCENH3* Zielregion amplifiziert und anschließend für den T7E1 Assay verwendet, wobei keine der Pflanzen eine Mutation im *NbCENH3* aufwies (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass ein geringer Anteil an mutierten Sequenzen in einer Probe eventuell nicht vom T7E1 Assay erfasst wurde, erfolgte eine direkte Sequenzierung der PCR-Produkte von ausgewählten Pflanzen. Bei den fünf sequenzierten Proben konnte jedoch ebenfalls keine Mutation detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.3 Etablierung einer gRNA-vermittelten Cas9 Plattform in *N. tabacum* unter Verwendung von *gfp* als Zielgen

3.3.1 Klonierung des *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 Konstrukts

Zur Herstellung des *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 Konstrukts wurde das Gateway[®] kompatible gRNA/Cas9 Vektorsystem aus dem Labor von H. Puchta (KIT Karlsruhe, Deutschland; Fauser *et al.* 2014) verwendet. Im ersten Schritt wurde ein 20 bp langes gRNA-Bindemotiv (*Protospacer*) im *gfp* identifiziert, das stromabwärts von ‚NGG‘ flankiert ist. Die Zielsequenz liegt, wie die der *gfp*-spezifischen TALENs, im größten *Loop* des GFPs (siehe Abb. 4). Dieser *Protospacer* wurde in die *BbsI* Klonierungsstellen von pEn-Chimera eingefügt, um den Eingangsvektor zu bilden, welcher in der darauffolgenden Gateway[®] Reaktion in den Zielvektor (pDe-CAS9) fusioniert und so der Vektor mit der *gfp*-spezifischen gRNA (pSI24) hergestellt wurde. Die erfolgreiche Klonierung des Konstrukts wurde mittels Kolonie-PCR und durch Sequenzierung bestätigt. Das fertige Konstrukt beinhaltet die in Abb. 22 dargestellten Komponenten.



Abb. 22: Schematische Darstellung des *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 Vektors (pSI24). Der Vektor wurde für die Etablierung der gRNA-vermittelten Cas9 Plattform verwendet. LB: linke Abgrenzung der T-DNA (*Left Border*); RB: rechte Abgrenzung der T-DNA (*Right Border*); PcUbi4-2 P: Promotersequenz des *UBIQUITIN-4-2* Gens aus *Petroselinum crispum*; Cas9 c.o.: *Streptococcus pyogenes* Cas9 Codon-optimiert für *A. thaliana*; pea3A T: terminale Sequenz des *pea3A* Gens aus *Pisum sativum*; U6-26 P: U6-26 Promoter von *A. thaliana*; *Protospacer*: 20 bp lange Zielsequenz im *gfp*, gRNA: *guide RNA*; PAT Kasette: Expressionskassette für das *PHOSPHINOTHRICIN-ACETYLTRANSFERASE* Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* (vermittelt Resistenz gegenüber Bialaphos) mit Promoter und terminaler Sequenz des *CaMV 35S*.

3.3.2 Validierung der *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 mittels transienter Co-Expression mit einem Testvektor

Um die Effizienz der *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 zu validieren wurde wie bei den TALENs eine transiente Co-Expression mit einem Testvektor durchgeführt (Kapitel 3.1.2). Als Testvektor diente ebenfalls pTARGET-*gfp1*, da die Zielregion der gRNA/Cas9 innerhalb der TALEN Zielregion liegt. Der gleichzeitige Beschuss von Testvektor, *gfp*-spezifischer gRNA/Cas9 und *mCherry* Vektor führte zu rot und gelb fluoreszierenden Zellen (Abb. 23); die Ergebnisse der Auswertung sind in Tab. 12 dargestellt. Die Kontrolle des Testvektors erfolgte bereits bei den *gfp*-spezifischen TALENs (siehe Tab. 5) und wurde hier nicht noch einmal wiederholt.

Tab. 12: Effizienz des *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 Konstrukts in biolistisch transformierten Tabakblättern.

Zielgen	Art der Endonuklease	verwendete Konstrukte	Experiment	YFP Zellen	mCherry Zellen	YFP/mCherry Zellen (in %)
<i>gfp</i>	gRNA/Cas9	pTARGET- <i>gfp1</i>	1	273	371	73,6
		+ <i>gfp</i> -spezifische	2	342	389	87,9
		gRNA/Cas9	3	324	499	64,9
		∅	∅	313 ± 29	420 ± 57	74,6

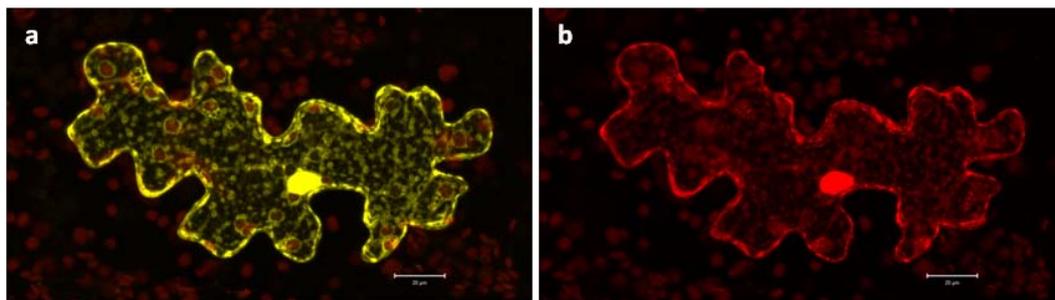


Abb. 23: *yfp* Expression nach gRNA/Cas9-induzierten Mutationen. Repräsentative Epifluoreszenz in einer transgenen Tabakzelle ein Tag nach dem Partikelbeschuss mit *gfp*-spezifischem Test- und gRNA/Cas9 Vektor. mCherry wurde zur Normalisierung des Beschusses co-bombardiert. a) YFP Fluoreszenz, b) mCherry Fluoreszenz; Balken 20 µm.

3.3.3 Re-Transformation von Reporterpflanzen und Analyse der *gfp* Zielregion in Regeneraten

Der binäre Vektor pSI24 (Kapitel 3.3.1) wurde für Re-Transformationsexperimente verwendet, bei denen die Nachkommen der transgenen Tabaklinie TSP1L20-1-T₁1, in welcher nur eine Kopie vom *gfp* vorhanden ist, als Donorpflanzen dienten. Der Agrobakterien-vermittelte Gentransfer von Blattstücken wurde wie in Kapitel 2.2.22 beschrieben durchgeführt und Bialaphos als selektives Agens verwendet. Von Bialaphos-resistenten Regeneraten wurde genomische DNA extrahiert und als Matrize für verschiedene PCRs verwendet, um die Präsenz von *PAT*, *Cas9* und gRNA nachzuweisen (Primerpaare sind in Tab. 2 aufgelistet). Nur in 21 von insgesamt 36 selektierten Regeneraten wurde das *PAT* Gen nachgewiesen; 15 von diesen 21 Pflanzen enthielten sowohl die *Cas9* als auch die gRNA. Die verbliebenen sechs Pflanzen wiesen entweder nur das *PAT* Gen (#120, #121, #257), *PAT* und *Cas9* (#249, #250) oder *PAT* und gRNA (#255) auf (Tab. 13).

Tab. 13: Übersicht primär transgener Pflanzen aus Transformationsexperimenten mit dem *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 Vektor pSI24. Bei den aufgelisteten Pflanzen handelt es sich nur um die Regenerate, in denen das *PAT* Gen mittels PCR nachgewiesen werden konnte.

Bezeichnung Pflanze	PCR-Ergebnisse			Ergebnis T7E1 Assay	Bezeichnung Pflanze	PCR-Ergebnisse			Ergebnis T7E1 Assay
	<i>PAT</i>	<i>Cas9</i>	gRNA			<i>PAT</i>	<i>Cas9</i>	gRNA	
#100	+	+	+	-	#257	+	-	-	-
#120	+	-	-	-	#258	+	+	+	+
#121	+	-	-	-	#259	+	+	+	+
#122	+	+	+	+	#260	+	+	+	+
#125	+	+	+	+	#261	+	+	+	+
#126	+	+	+	-	#262	+	+	+	+
#232	+	+	+	-	#264	+	+	+	+
#249	+	+	-	-	#266	+	+	+	+
#250	+	+	-	-	#267	+	+	+	+
#254	+	+	+	+	#268	+	+	+	+
#255	+	-	+	-					

Anschließend wurde die *gfp* Zielregion der 15 Individuen, bei denen *PAT*, *Cas9* und gRNA nachweisbar waren, unter Verwendung des T7E1 Assays charakterisiert. Zwölf der 15 untersuchten Pflanzen wiesen eine zweite Bande auf (Effizienz 80,0 %), wohingegen keine der sechs transgenen Pflanzen, bei denen *Cas9* und/oder gRNA fehlten, ein positives Ergebnis im T7E1 Assay erzielten (Abb. 24).

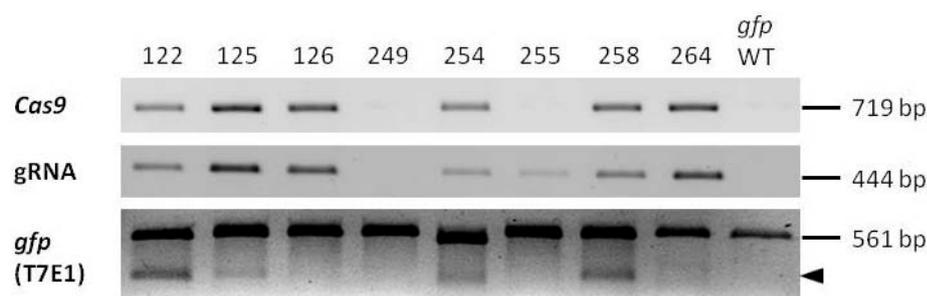


Abb. 24: Ergebnisse von PCR und T7E1 Assay in ausgewählten primär transgenen Pflanzen, die mit dem *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 Vektor transformiert wurden. Die oberen beiden Reihen zeigen die Präsenz von *Cas9* und gRNA. Für den T7E1 Assay (untere Reihe) wurde zunächst die *gfp* Zielregion amplifiziert und das PCR-Produkt aufgereinigt. Das Vorhandensein von *gfp* Mutationen führte dazu, dass das 561 bp große PCR-Produkt aufgrund der Heteroduplexbildung in zwei etwa gleich große Fragmente geteilt wurde, welche im Gel als eine Bande sichtbar sind (durch Pfeilspitze markiert). 122, 125, 126, ect.: Bezeichnung der T₀ Pflanzen; *gfp* WT: genomische DNA einer *gfp* WT Pflanze als Negativkontrolle.

Um die Größe und Art der Mutationen zu bestimmen, wurden die *gfp* Amplifikate von fünf der 12 Mutations-tragenden Pflanzen (#122, #125, #254, #258, #264) subkloniert und einzelne Klone sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass es sich um unterschiedlich große Deletionen (1-91 bp) und Insertionen von 1 bp handelte (Abb. 25). Die Pflanzen #122 und #125 beherbergten beide mehr als eine mutierte *gfp* Sequenz, während die anderen drei Pflanzen nur eine einzelne enthielten. In allen fünf Pflanzen wurde neben den mutierten Sequenzen auch die *gfp* WT Sequenz nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass es sich hier um heterozygote und/oder chimäre Pflanzen handelte.

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC		
122	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0	(2x)
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1	(6x)
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1	(3x)
	GTGAACCGCATCGAGC-----TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-15	(1x)
125	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0	(4x)
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1	(5x)
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7	(1x)
254	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0	(6x)
	-----ACATCC	-54	(4x)
258	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0	(9x)
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA-----TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-6	(1x)
264	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0	(2x)
	-----	-91	(6x)

Abb. 25: Sequenzierungsergebnisse von ausgewählten primär transgenen Pflanzen, die mit dem *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 Vektor transformiert wurden. Die PCR-Produkte von T7E1 positiven Pflanzen wurden subkloniert und einzelne Amplifikate sequenziert. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) sowie die Anzahl an Kolonien mit der entsprechenden *gfp* Sequenz befinden sich auf der rechten Seite der Sequenzen.

3.3.4 Analyse der *gfp* Zielregion in sexuellen Nachkommen primär transgener Pflanzen

Um Rückschlüsse auf die Vererbbarkeit der induzierten *gfp* Mutationen zu erhalten, wurden jeweils 15-50 Nachkommen der primär transgenen Pflanzen #125, #254 und #258 untersucht (jede enthielt eine oder mehrere *gfp* Mutationen). Des Weiteren wurde die T₀ Pflanze #126 ausgewählt, in der trotz des Nachweises von *Cas9* und gRNA keine *gfp* Mutation detektiert worden waren, um zu untersuchen ob Mutationen in Pflanzen der nächsten Generation entstehen können, in denen *Cas9* vorhanden ist. Für die Nachkommenschaftsanalysen wurden die Samen der selbstbestäubten T₀ Pflanzen, bzw. später von ausgewählten T₁ Pflanzen, auf Erde angezogen und nach etwa vier Wochen genomische DNA aus Blattmaterial extrahiert, die *gfp* Zielregion amplifiziert und das aufgereinigte PCR-Produkt für den T7E1 Assay verwendet. Die PCR-Produkte von T7E1 negativen Proben wurden direkt sequenziert, um zwischen *gfp* WT Pflanzen und homozygoten Mutanten zu unterscheiden (Abb. 26). Manche Proben zeigten im Assay ein falsch-negatives Ergebnis, was anhand eines Doppelpeaks im Chromatogramm sichtbar wurde. Von den T7E1 positiven Pflanzen (das heißt diese mit zwei oder mehreren *gfp* Varianten) wurden drei bis fünf zufällig ausgewählt, von denen einzelne, subklonierte *gfp* Amplifikate sequenziert wurden, um die Mutationen zu charakterisieren.

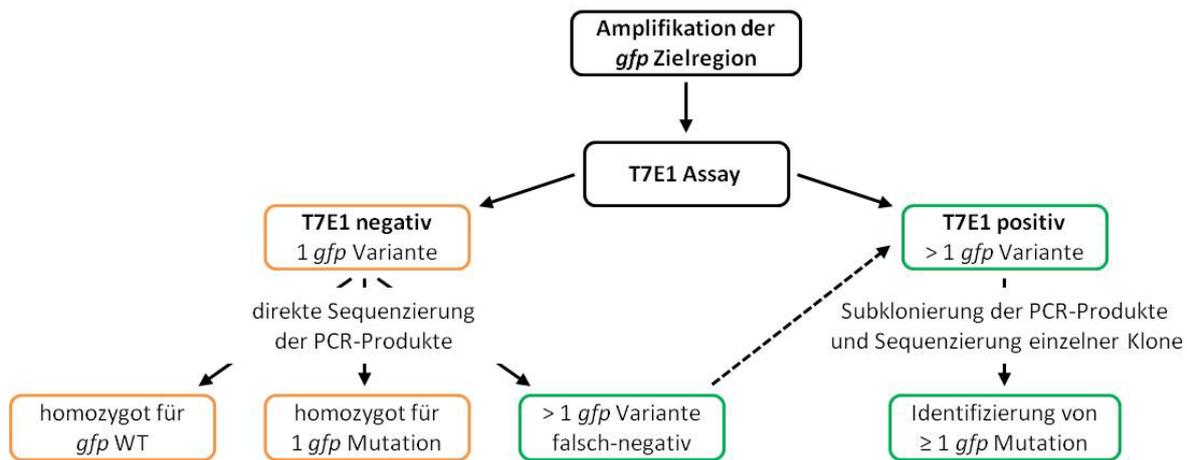


Abb. 26: Übersicht über die Vorgehensweise bei den Nachkommenanalysen. Zur Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten/chimären Pflanzen, wurde die *gfp* Zielregion amplifiziert und das aufgereinigte PCR-Produkt in einem T7E1 Assay verwendet. Das PCR-Produkt von Pflanzen mit einem T7E1 negativen Ergebnis wurde direkt sequenziert, was eine Unterscheidung zwischen homozygoten *gfp* WT Pflanzen und homozygoten *gfp* Mutanten ermöglichte. Mittels dieser direkten Sequenzierung des PCR-Produktes konnten in einigen Fällen auch falsch-negative Ergebnisse aus dem T7E1 Assay identifiziert werden. Bei den T7E1 positiven Pflanzen wurden zufällig einige ausgewählt, deren *gfp* Amplifikate subkloniert und einzelne Klone sequenziert wurden, um die vorhandene(n) *gfp* Mutation(en) zu charakterisieren.

3.3.4.1 Nachkommenschaftsanalyse von T₀ Pflanze #125

Basierend auf den Ergebnissen vom T7E1 Assay und der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten enthielten 28 von 50 untersuchten direkten Nachkommen der T₀ Pflanze #125 verschiedene *gfp* Varianten, fünf hatten das *gfp* WT Allel fixiert und 17 ein mutiertes *gfp* Allel. In 25 von 50 T₁ Pflanzen die detaillierter untersucht wurden, wurde die 1 bp Insertion, die in der primär transgenen Pflanze bereits vorhanden war, wiedergefunden, während die 7 bp Deletion nicht unter diesen Nachkommen detektiert wurde. Neben der einen primären Mutation konnten vier weitere charakterisiert werden, bei denen es sich um Deletionen von 1 bis 24 bp handelte (Abb. 28a). Mittels PCR wurde die *Cas9* in 29 von den 50 T₁ Pflanzen nachgewiesen (Abb. 27, Anhang Tab. A 6). Unter den homozygoten Mutanten befanden sich zwei Pflanzen, bei denen die T-DNA nicht vorhanden war (Pflanze #125-05, #125-28). Es handelte sich hier also um genetisch veränderte, transgenfreie Pflanzen.

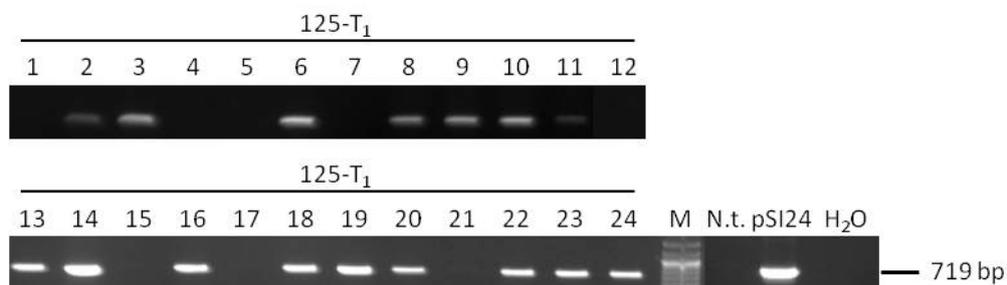


Abb. 27: PCR-Ergebnisse ausgewählter T₁ Pflanzen der primär transgenen Pflanze #125. Nachweis der *Cas9* erfolgte durch Amplifikation mit dem Primerpaar *Cas9* F2 und *Cas9* R2 (siehe Tab. 2). Das zu erwartende PCR-Produkt betrug 719 bp. M: Größenstandard, N.t.: genomische DNA von *N. tabacum* WT als Negativkontrolle, pSI24: pDNA des Transformationsvektors als Positivkontrolle, H₂O: Negativkontrolle.

Die T₁ Pflanzen #125-14 und #125-19 wurden für die Analyse ihrer Nachkommen ausgewählt, da in diesen Mutationen, die keine Verschiebung des translationalen Leserahmens verursachen, detektiert worden waren. Diese Mutationen sollten in den Nachkommen von den anderen *gfp* Varianten separiert werden, um für spätere Fluoreszenzanalysen Verwendung zu finden.

a

T₀ Generation

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	
125	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1

T₁ Generation

125-05	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
125-14	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAT---CTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-3
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG-----AGGAGGACGGCAACATCC	-6
125-19	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----CATCC	-24
125-20	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA-TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1*

b

T₂ Generation

Nachkommen der Pflanze #125-14		
125-14-03	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1/+1*
125-14-07	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG-CTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1*
125-14-08	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAT---CTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-3*
125-14-14	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG-CTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACT~TTTCAAGGAGGACGGCAA	+77
Nachkommen der Pflanze #125-19		
125-19-05	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
125-19-07	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----CATCC	-24

Abb. 28: Ergebnisse der Nachkommenschaftsanalyse von T₀ Pflanze #125. a) Sequenzierungsergebnisse der primär transgenen Pflanze sowie ausgewählter T₁ Pflanzen. b) Detektierte Mutationen in ausgewählten T₂ Pflanzen der beiden T₁ Pflanzen #125-14 und #125-19. Die PCR-Produkte von Pflanzen, die im T7E1 Assay keine zweite Bande zeigten, wurden direkt sequenziert. Von ausgewählten T7E1 positiven Pflanzen wurden einzelne *gfp* Amplifikate subkloniert und diese sequenziert. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen. Homozygot mutierte Pflanzen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

Von den 14 untersuchten Nachkommen der Pflanze #125-14 beherbergten fünf mindestens zwei verschiedene *gfp* Varianten, während die restlichen neun Pflanzen eine Mutation genetisch fixiert hatten. Unter den homozygoten Mutanten wurde die maternale 3 bp Deletion wiedergefunden (Abb. 28b). Von einer der heterozygot/chimären Pflanzen wurden einzelne *gfp* Amplifikate sequenziert, wodurch eine 1 bp Deletion und eine 77 bp große Insertion identifiziert wurden, während die *gfp* WT Sequenz abwesend war (#125-14-14). Die integrierte 77 bp lange Sequenz wurde mit verschiedenen Datenbanken abgeglichen, wobei sich herausstellte, dass Teile der Sequenz Homologien zu Sequenzen aus *Agrobacterium* haben. Dies weist drauf hin, dass die Insertion bereits in der primär transgenen Pflanze #125 stattfand, die Mutation aber erst in der T₂ Generation detektiert wurde.

Cas9 und gRNA wurden in zehn von den 14 T₂ Pflanzen nachgewiesen (Anhang Tab. A 12). Eine der vier transgenfreien Pflanzen war homozygot für die 3 bp Deletion (#125-14-08), während die anderen drei mehrere *gfp* Varianten beherbergten.

Vierzehn Nachkommen der T₁ Pflanze #125-19 wurden mit dem Ergebnis analysiert, dass neun Individuen zwei oder mehrere *gfp* Varianten beherbergten, während fünf Nachkommen eine mutierte *gfp* Sequenz genetisch fixiert hatten. Die 1 bp Insertion, welche sowohl in der T₁ als auch in der T₀ Generation bereits detektiert wurde, konnte in den T₂ Nachkommen wiedergefunden werden. Alle fünf homozygoten T₂ Pflanzen trugen diese Mutation. Zwei Pflanzen, die T7E1 positiv waren, wurden detaillierter untersucht und die Sequenzierung einzelner *gfp* Amplifikate identifizierte neben der 1 bp Insertion auch die maternale 24 bp Deletion; die *gfp* WT Sequenz konnte nicht mehr detektiert werden (Abb. 28b). Mittels PCR wurde die Präsenz von *Cas9* und gRNA in allen 14 T₂ Individuen nachgewiesen (Anhang Tab. A 12).

3.3.4.2 Nachkommenschaftsanalyse von T₀ Pflanze #126

In der primär transgenen Pflanze #126 konnte mittels PCR die Präsenz von *Cas9* und gRNA nachgewiesen, aber keine Mutation in der *gfp* Zielregion detektiert werden. Die Analyse von 50 Nachkommen sollte zeigen, ob Mutationen in der nächsten Generation erzeugt werden können. Der T7E1 Assay ergab, dass 29 von den 50 untersuchten Pflanzen zwei oder mehrere *gfp* Varianten enthielten (T7E1 positiv). Als die Präsenz von *Cas9* mittels PCR nachgewiesen wurde, zeigte sich, dass auch *Cas9* negative Pflanzen ein positives Ergebnis im T7E1 Assay erzielten. Dieses Resultat wies darauf hin, dass bereits in der T₀ Pflanze #126 Mutationen erzeugt wurden, die, unabhängig von der *gfp*-spezifischen gRNA/*Cas9* T-DNA, an einige Nachkommen vererbt wurden. Aus diesem Grund wurden auch in diesem Fall die PCR-Produkte von T7E1 negativen Nachkommen direkt sequenziert, um eventuell vorhandene homozygote Mutanten zu identifizieren. Die Ergebnisse von T7E1 Assay und direkter Sequenzierung ergaben, dass von 50 untersuchten Pflanzen 29 zwei oder mehrere *gfp* Varianten trugen, 11 das *gfp* WT Allel und 10 ein mutiertes *gfp* Allel genetisch fixiert hatten. Bei den detektierten Mutationen handelte es sich um Mikrodeletionen (1 bis 4 bp) und die bereits mehrfach gefundene 1 bp Insertion (Abb. 29a). Unter den insgesamt 16 *Cas9* negativen T₁ Pflanzen befanden sich zwei homozygote Mutanten, die beide die 1 bp Insertion hatten (Anhang Tab. A 7).

Die T₁ Pflanze #126-05 wurde hinsichtlich einer *gfp* Mutation (1 bp Deletion) als homozygot identifiziert. Aus diesem Grund wurden nur fünf T₂ Individuen untersucht, von denen drei homozygot für das *gfp* WT Allel waren, während die anderen beiden die maternale 1 bp Deletion genetisch fixiert hatten (Abb. 29b). Der Nachweis von *Cas9* und gRNA mittels PCR ergab, dass die Transgen-Sequenzen nur in den beiden homozygoten Mutanten vorhanden waren (Anhang Tab. A 12).

Von der heterozygoten/chimären T₁ Pflanze #126-40 wurden 12 Nachkommen mit dem Ergebnis analysiert, dass in einer Pflanze nur die *gfp* WT Sequenz gefunden werden konnte, während zwei T₂

Individuen die maternale 3 bp Deletion genetisch fixiert hatten (Abb. 29b). Die verbliebenen neun Nachkommen beherbergten zwei oder mehr *gfp* Varianten und von einer dieser Pflanzen wurden einzelne Amplifikate sequenziert. Dadurch konnte eine 2 bp Deletion neben der *gfp* WT Sequenz identifiziert werden. In neun der 12 Nachkommen konnten die *Cas9* und gRNA Sequenzen mittels PCR nachgewiesen werden (Anhang Tab. A 12). Unter den transgenfreien Pflanzen befanden sich keine homozygoten Mutanten, aber eine Heterozygote/Chimäre.

a

T₀ Generation

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	
126	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0

T₁ Generation

126-05	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1*
126-13	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
126-38	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAT----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-4*
126-40	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG--TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-3

b

T₂ Generation

Nachkommen der Pflanze #126-05		
126-05-02	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0*
126-05-04	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1*
Nachkommen der Pflanze #126-40		
126-40-06	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG--TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-3*
126-40-13	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA--TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-2

Abb. 29: Ergebnisse der Nachkommenschaftsanalyse von T₀ Pflanze #126. a) *Gfp* WT Sequenz und Sequenzierungsergebnisse der T₀ Pflanze #126 sowie ausgewählter T₁ Nachkommen. b) Detektierte Mutationen (entweder durch direkte Sequenzierung von PCR-Produkten oder Sequenzierung von einzelnen subklonierten *gfp* Amplifikaten) von ausgewählten T₂ Nachkommen der T₁ Pflanzen #126-05 und #126-40. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen. Homozygot mutierte Pflanzen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

3.3.4.3 Nachkommenschaftsanalyse von T₀ Pflanze #254

Von den 15 untersuchten T₁ Individuen der T₀ Pflanze #254 waren vier T7E1 negativ und zeigten bei der direkten Sequenzierung der PCR-Produkte, dass es sich hier um *gfp* WT Pflanzen handelte. Die restlichen 11 T₁ Pflanzen zeigten ein positives Ergebnis im T7E1 Assay und vier davon wurden zufällig ausgewählt und detaillierter untersucht. Die Sequenzierung von subklonierten *gfp* Amplifikaten ergab, dass in allen vier Pflanzen sowohl die 54 bp Deletion aus der Mutterpflanze, als auch eine neue 132 bp große Deletion vorhanden waren (Abb. 30a). In einer der vier Pflanzen (#254-03) konnte außerdem die *gfp* WT Sequenz detektiert werden. Die Präsenz von *Cas9* wurde in den mutierten Pflanzen nachgewiesen, während die *gfp* WT Pflanzen transgenfrei waren (Anhang Tab. A 8).

Die *gfp* Zielsequenz von 15 Nachkommen der T₁ Pflanze #254-08 wurde untersucht und zeigte bei einigen Pflanzen bereits als Ergebnis der PCR, dass mehrere *gfp* Varianten vorhanden waren. Insgesamt beherbergten 12 von 15 T₂ Pflanzen zwei oder mehrere *gfp* Varianten, während die

verbliebenen drei Pflanzen die maternale 54 bp Deletion genetisch fixiert hatten (Abb. 30b). Von einem Individuum der heterozygoten/chimären Pflanzen wurden einzelne, subklonierte *gfp* Amplifikate sequenziert und die ebenfalls maternale 132 bp Deletion neben der 54 bp Deletion identifiziert (#254-08-09). Die *gfp* WT Sequenz konnte nicht detektiert werden. Alle untersuchten T₂ Pflanzen enthielten sowohl die *Cas9* als auch die gRNA Sequenz (Anhang Tab. A 13).

a

T₀ Generation

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	
254	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	-----ACATCC	-54

T₁ Generation

254-03	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	-----ACATCC	-54
	-----	-132
254-08	-----ACATCC	-54
	-----	-132

b

T₂ Generation

Nachkommen der Pflanze #254-08		
254-08-05	-----ACATCC	-54*
254-08-09	-----ACATCC	-54
	-----	-132

Abb. 30: Ergebnisse der Nachkommenschaftsanalyse von T₀ Pflanze #254. a) Ergebnisse aus der Sequenzierung von subklonierten *gfp* Amplifikaten der T₀ Pflanze #254 sowie von zwei ausgewählten T₁ Pflanzen. b) Detektierte Mutationen in ausgewählten T₂ Individuen der T₁ Pflanze #254-08. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen. Homozygot mutierte Pflanzen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

3.3.4.4 Nachkommenschaftsanalyse von T₀ Pflanze #258

Von der primär transgenen Pflanze #258 wurden ebenfalls 15 Nachkommen untersucht. Aus den Ergebnissen von T7E1 Assay und direkter Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte sich, dass zehn der Nachkommen zwei oder mehrere *gfp* Varianten beherbergten, während eine Pflanze homozygot für das *gfp* WT Allel und vier für ein mutiertes *gfp* Allel waren. Die 6 bp Deletion, welche in der Mutterpflanze detektiert wurde, konnte nicht unter den sieben im Detail untersuchten Nachkommen wiedergefunden werden. Stattdessen zeigten sich bei den Sequenzierungsergebnissen subklonierter *gfp* Amplifikate drei neue Mutationen (Abb. 31), darunter dieselbe 1 bp Insertion, die schon in anderen primär transgenen Pflanzen oder deren Nachkommen gefunden wurde. Des Weiteren wurden eine 51 bp große Deletion und eine Kombination aus 13 bp Deletion und 2 bp Insertion nachgewiesen. Die *gfp* WT Sequenz wurde nicht unter den jeweils zehn sequenzierten einzelnen Amplifikaten gefunden. Mittels PCR wurde die Präsenz von *Cas9* in 11 T₁ Individuen detektiert; unter den verbliebenen vier transgenfreien Pflanzen befanden sich zwei homozygote Mutanten (Anhang Tab. A 8).

T₀ Generation

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	
258	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA-----TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-6

T₁ Generation

258-01	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
258-03	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1
	-----GAGGACGGCAACATCC	-51
258-06	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGTG-----CGGCAACATCC	-13/+2

Abb. 31: Ergebnisse der Nachkommenschaftsanalyse von T₀ Pflanze #258. Im oberen Teil der Abbildung ist die *gfp* WT Sequenz und das Ergebnis aus der Sequenzierung von subklonierten *gfp* Amplifikaten der T₀ Pflanze #258 gezeigt. Im unteren Teil sind die Sequenzierungsergebnisse (entweder direkte Sequenzierung von PCR-Produkten oder Sequenzierung von einzelnen subklonierten *gfp* Amplifikaten) von ausgewählten T₁ Nachkommen abgebildet. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen. Homozygot mutierte Pflanzen sind mit einem Asterisk gekennzeichnet.

3.3.5 Analyse der *gfp* Zielregion in regenerierten Pflanzen aus einer embryogenen Pollenkultur der T₀ Pflanze #125

In dem Versuch nicht-chimäre, homozygote Mutanten von der chimären T₀ Mutterpflanze #125 zu erhalten, wurde eine embryogene Pollenkultur initiiert (Kapitel 2.2.24). Aus zwei Isolationen konnten insgesamt 62 Bialaphos-resistente Pflanzen regeneriert werden und in allen Regeneraten wurde die Präsenz von *Cas9* mittels PCR nachgewiesen (Anhang Tab. A 9). Von genomischer DNA wurde die *gfp* Zielregion amplifiziert und das aufgereinigte PCR-Produkt für den T7E1 Assay verwendet. Wie bei den Nachkommen aus der Selbstung, wurden auch hier die PCR-Produkte T7E1 negativer Pflanzen für eine direkte Sequenzierung verwendet, während die *gfp* Amplifikate von zufällig ausgewählten T7E1 positiven Pflanzen subkloniert und anschließend einzelne Klone sequenziert wurden.

Von 62 regenerierten Pflanzen hatten 25 zwei oder mehrere *gfp* Varianten, während bei 37 Pflanzen ein mutiertes Allel genetisch fixiert vorlag; es konnte keine Pflanze identifiziert werden, die homozygot für das *gfp* WT Allel war. Neben den Mutationen, die in der primär transgenen Pflanze detektiert wurden (7 bp Deletion, 1 bp Insertion), konnten neue Mutationen nachgewiesen werden. Darunter befanden sich weitere Deletionen (1-21 bp), aber z.B. auch ein Austausch von 2 bp (#125-P58; Abb. 32). Insgesamt wurden 12 Mutationen in den 42 detailliert untersuchten Regeneraten detektiert, von denen neun genetisch fixiert vorlagen. Darunter befanden sich auch die 1 bp Insertion und die 7 bp Deletion aus der Mutterpflanze. In diesen Pflanzen konnte jeweils nur eine einzelne mutierte *gfp* Sequenz nachgewiesen werden, während die *gfp* WT Sequenz nicht gefunden wurde.

T₀ Generation

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	
125	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1

T₁ Generation

125-P01	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7*
125-P08	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1a*
125-P13	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC-----CAAGGAGGACGGCAACATCC	-5
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC-----AAAGGAGGACGGCAACATCC	-6/+1
125-P16	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA-TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1b*
125-P34	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
125-P39	GTGAACCGCATCGAGC-----CAAGGAGGACGGCAACATCC	-16*
125-P48	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-----AGGAGGACGGCAACATCC	-4*
125-P52	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----CAAGGAGGACGGCAACATCC	-9*
125-P53	GTGAACCGCATCGAGCTGA-----ACGGCAACATCC	-21*
125-P58	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACGGCAAGGAGGACGGCAACATCC	-2/+2*
125-P61	-----	-228

Abb. 32: Vereinzeln von mutierten *gfp* Sequenzen durch Regeneration aus einer embryogenen Pollenkultur. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Ergebnisse aus der Sequenzierung von subklonierten *gfp* Amplifikaten der T₀ Pflanze #125. Im unteren Teil sind die Sequenzen von ausgewählten Regeneraten, die aus Pollen der T₀ Pflanze #125 entstanden, dargestellt. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen. Homozygot mutierte Pflanzen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

Regenerierte Pflanzen aus einer embryogenen Pollenkultur haben entweder einen haploiden oder doppelhaploiden Chromosomensatz. Bei dem allotetraploiden *N. tabacum* werden die Regenerate mit einem Chromosomensatz von $1n = 2x$ als dihaploid bezeichnet, da sie zwar haploid sind aber dennoch zwei Teilgenome enthalten; doppelhaploide Pflanzen haben hingegen einen Chromosomensatz von $2n = 4x$. Die dihaploiden Pflanzen sind aufgrund ihres auf den gametophytischen Zustand reduzierten Genoms nicht in der Lage Samen zu bilden und wären deshalb, ohne vorherige Behandlung mit Colchicin, ungeeignete Kandidaten für die sexuelle Vermehrung. Aus diesem Grund wurde die Ploidie von zur Vermehrung ausgewählten Pflanzen mittels Durchflusszytometrie gemessen (Kapitel 2.2.25). Doppelhaploide Regenerate mit ausgebildetem Wurzelsystem wurden in Erde überführt und bis zur Samenreife gebracht, während dihaploide Pflanzen mit Colchizin behandelt wurden (Kapitel 2.2.26), um die Genomaufdopplung zu induzieren und nachfolgend die Bildung von Samen zu ermöglichen. Von 12 gemessenen Pflanzen waren sieben doppelhaploid und fünf dihaploid (Tab. 14). Drei der fünf dihaploiden Pflanzen wurden einer Colchizinbehandlung unterzogen und anschließend in Erde überführt. Jedoch hat keine der behandelten Pflanzen Samen ausgebildet.

Tab. 14: Ergebnisse der Ploidiemessung von ausgewählten Regeneraten aus der embryogenen Pollenkultur von T₀ Pflanze #125.

Pflanze	Peak	Ploidie	Colchizin-behandlung	Samenernte
Kontrolle 1	52,38	tetraploid	-	-
Kontrolle 2	52,72	tetraploid	-	-
#125-P01	73,00	doppelhaploid	nein	
#125-P06	52,50	doppelhaploid	nein	ja
#125-P08	51,20	doppelhaploid	nein	ja
#125-P13	51,71	doppelhaploid	nein	ja
#125-P14	51,76	doppelhaploid	nein	ja
#125-P30	50,03	doppelhaploid	nein	ja
#125-P34	27,44	dihaploid	nein	-
#125-P39	27,57	dihaploid	ja	keine Samen
#125-P43	27,80	dihaploid	nein	-
#125-P44	51,70	doppelhaploid	nein	ja
#125-P48	27,39	dihaploid	ja	keine Samen
#125-P52	27,48	dihaploid	ja	keine Samen

3.3.6 Analyse der T₂ Generation von Regeneraten aus der embryogenen Pollenkultur

Fünf Nachkommen der Pflanze #125-P58, welche anhand der Ergebnisse des T7E1 Assays und direkter Sequenzierung als homozygot charakterisiert worden war (Abb. 33a), wurden für die Analyse der Vererbung induzierter Mutationen verwendet. Die aus Pflanze #125-P58 stammende Mutation, ein 2 bp Austausch, konnte in allen fünf T₂ Individuen detektiert werden und lag in diesen Pflanzen auch homozygot vor (Abb. 33b). Zudem wurden in all diesen Nachkommen auch *Cas9* und *gRNA* nachgewiesen (Anhang Tab. A 13), was die erwartete Homozygotie der T-DNA in der doppelhaploiden Pflanze #125-P58 bestätigte.

a

T₀ Generation

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	
125	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1

T₁ Generation

125-P58	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACGGCAAGGAGGACGGCAACATCC	+2/-2*
125-P61	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	-----	-228

b

T₂ Generation

Nachkommen der Pflanze #125-P58		
125-P58-01	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACGGCAAGGAGGACGGCAACATCC	+2/-2*
Nachkommen der Pflanze #125-P61		
125-P61-05	-----	-228*
125-P61-08	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA---AAGGAGGACGGCAACATCC	-4*
125-P61-10	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA---AAGGAGGACGGCAACATCC	-4
	-----	-228

Abb. 33: Vererbung von induzierten *gfp* Mutationen der T₀ Pflanze #125 in die T₂ Generation nach embryogener Pollenkultur. In a) sind die Sequenzierungsergebnisse von subklonierten *gfp* Amplifikaten der T₀ Pflanze #125 sowie von zwei Regeneraten aus der embryogenen Pollenkultur (#125-P58, #125-P61) gezeigt. b) Sequenzierungsergebnisse (entweder direkte Sequenzierung von PCR-Produkten oder Sequenzierung von einzelnen, subklonierten *gfp* Amplifikaten) von ausgewählten T₂ Individuen. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen. Homozygot mutierte Pflanzen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

Die Analyse der Nachkommen der heterozygot/chimären Pflanze #125-P61 ergab, dass die Hälfte der 14 untersuchten Pflanzen zwei oder mehr *gfp* Varianten beherbergte. Ausreichend hierfür waren die Ergebnisse der Gelelektrophorese der PCRs, bei denen mehrere Banden zu sehen waren (Abb. 34). Die restlichen sieben T_2 Individuen hatten jeweils eine Mutation genetisch fixiert, darunter auch die maternale 228 bp große Deletion (Abb. 33b). Des Weiteren konnte eine 4 bp Deletion detektiert werden. Bei den Sequenzierungsergebnissen von einzelnen, subklonierten *gfp* Amplifikaten der Pflanze #125-P61-10 zeigten sich sowohl die 228 bp als auch die 4 bp Deletion. Die *gfp* WT Sequenz konnte in dieser Pflanze nicht detektiert werden (Abb. 33b). Alle 14 analysierten Pflanzen besaßen die *Cas9* und die gRNA Sequenz (Anhang Tab. A 13).

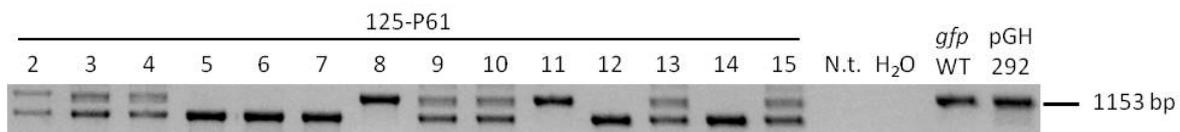


Abb. 34: PCR-Ergebnisse der Nachkommen von T_1 Pflanze #125-P61. Amplifikation von *gfp* mit den Primern GH Ubi10 F1 und GH GFP F1 (erwartetes Produkt: 1153 bp). Mehrere Banden weisen darauf hin, dass in den betreffenden Proben zwei oder mehrere *gfp* Varianten vorhanden sind. 2-15: Nummerierung der Nachkommen, N.t.: genomische DNA von *N. tabacum* WT als Negativkontrolle, H₂O: Negativkontrolle, *gfp* WT: genomische DNA von *gfp* WT Pflanze als Positivkontrolle, pGH292: pDNA des Transformationsvektors als Positivkontrolle.

3.3.7 Vorkommen von homozygoten Mutanten in der T_1 von selbstbestäubten T_0 Pflanzen im Vergleich zu Regeneraten aus der embryogenen Pollenkultur

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, wurden die Nachkommen von selbstbestäubten T_0 Pflanzen sowie die Regenerate aus der embryogenen Pollenkultur in heterozygote/chimäre Pflanzen, homozygote *gfp* WT Pflanzen oder homozygote *gfp* Mutanten unterteilt. In Tab. 15 sind die Ergebnisse zusammengefasst und für die Nachkommen der vier selbstbestäubten T_0 Pflanzen #125, #126, #254 und #258 wurden die Durchschnittswerte berechnet. Bei durchschnittlich 32,5 untersuchten T_1 Individuen von selbstbestäubten Mutterpflanzen waren 16,4 % homozygot für den *gfp* WT, 63,5 % beherbergten zwei oder mehr *gfp* Varianten und 20,1 % hatten eine *gfp* Mutation genetisch fixiert. Im Gegensatz dazu wurden unter den 62 untersuchten Regeneraten aus der embryogenen Pollenkultur 59,7 % als homozygote Mutanten identifiziert, während die restlichen 40,3 % heterozygot und/oder chimär waren. Homozygote *gfp* WT Pflanzen wurden nicht gefunden. Des Weiteren wurden bei der Analyse der Regenerate neben den zwei maternalen Mutationen auch zehn neue Mutationen detektiert, von denen sieben genetisch fixiert vorlagen. Bei den Nachkommen aus der Selbstbestäubung wurden im Durchschnitt 3,3 Mutationen identifiziert, darunter 0,6 von den maternalen Mutationen und 2,7 neu detektierte. Von diesen neu detektierten Mutationen lagen durchschnittlich nur 0,7 in genetisch fixiertem Zustand vor (Tab. 15).

Tab. 15: Häufigkeit von Mutationen unter Nachkommen, die entweder durch Selbstbestäubung oder durch embryogene Pollenkultur der T₀ Mutterpflanzen produziert wurden.

Bezeichnung T ₀ Pflanze	Selbstbestäubung					embryogene Pollenkultur
	#125	#126	#254	#258	∅	#125
Anz. untersuchter T ₁ Pflanzen	50	50	15	15	32,5	62
T ₁ <i>gfp</i> WT Pflanzen	10,0 % (5)	22,0 % (11)	26,7 % (4)	6,7 % (1)	16,4 % (5,3)	0 %* (0)
T ₁ heterozygote/chimäre Mutanten	56,0 % (28)	58,0 % (29)	73,3 % (11)	66,6 % (10)	63,5 % (18,0)	40,3 % (25)
T ₁ homozygote Mutanten	34,0 % (17)	20,0 % (10)	0 % (0)	26,7 % (4)	20,1 % (6,7)	59,7 % (37)
Anz. detektierter Mutationen in T ₀	2	0	1	1	1,3†	2
Anz. detektierter Mutationen in T ₁	5	4	2	3	3,3†	12
a) Anz. Mutationen die in T ₀ und T ₁ detektiert wurden	1	-	1	0	0,6†	2
nicht genetisch in T ₁ Pflanzen fixiert	0	-	1	0	0,3†	0
genetisch in T ₁ Pflanzen fixiert	1	-	0	0	0,3†	2
b) Anz. Mutationen die in T ₁ aber nicht in T ₀ detektiert wurden	4	4	1	3	2,7†	10
nicht genetisch in T ₁ Pflanzen fixiert	3	1	1	2	2,0†	3
genetisch in T ₁ Pflanzen fixiert	1	3	0	1	0,7†	7

* Pollenembryogenese wurde basierend auf Bialaphos-Selektion durchgeführt.

† Berechnung wurde ohne Pflanze #126 vorgenommen, bei der keine Mutation in der T₀ detektiert wurde.

3.3.8 Analyse der *gfp* Zielregion in somatischen Klonen der T₀ Pflanze #125

Sowohl der Zeitpunkt als auch der Ort der Mutagenese hat einen Einfluss darauf, ob eine Mutation in die nächste Generation übertragen wird oder nicht. Nicht alle Mutationen, die in den T₀ Pflanzen detektiert wurden, konnten wie bereits zuvor gezeigt in der nächsten Generation wiedergefunden werden (Kapitel 3.3.4). Deshalb wurde der Versuch unternommen, diese Mutationen durch vegetative Vermehrung zu erhalten. Blattstücke von T₀ Pflanze #125 wurden *in vitro* kultiviert und 15 Bialaphos-resistente Pflanzen regeneriert. Die *gfp* Zielregion dieser Regenerate wurde amplifiziert und die aufgereinigten PCR-Produkte für einen T7E1 Assay verwendet, durch den gezeigt werden konnte, dass 13 der 15 Regenerate zwei oder mehr *gfp* Varianten beherbergten. Vier von diesen T7E1 positiven Pflanzen wurden detaillierter untersucht, indem das *gfp* Amplifikat subkloniert und einzelne Klone sequenziert wurden. Durch die Sequenzierung konnte in einem Fall neben der *gfp* WT Sequenz nur eine veränderte Sequenz (die 7 bp Deletion; #125-SC05) detektiert werden, während in den anderen drei Pflanzen mehrere *gfp* Varianten vorhanden waren. Die letzteren Mutationen enthielten unter anderem die maternale 1 bp Insertion (#125-SC08) oder z.B. eine 92 bp Deletion kombiniert mit einer 2 bp Insertion (#125-SC01; Abb. 35). Die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte der zwei T7E1 negativen Regenerate ergab in beiden Fällen, dass die 1 bp Insertion genetisch fixiert vorlag (#125-SC02, #125-SC03). Insgesamt waren 86,7 % der untersuchten Regenerate heterozygot und/oder chimär hinsichtlich der Mutationen, während die restlichen 13,3 % homozygote Mutanten waren (Tab. A 10). Bemerkenswert ist, dass sowohl die 1 bp Insertion als auch

die 7 bp Deletion aus der T₀ Pflanze erhalten werden konnten und sechs weitere Mutationen auftraten (Abb. 35).

T₀ Generation

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	
125	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1

vegetative Erhaltung

125-SC01	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-8
	-----TTCTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-92/+2
125-SC02	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
125-SC03	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
125-SC04	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA---CAAGGAGGACGGCAACATCC	-3
	GTGAACCGCATCGAGCT-----GAGGACGGCAACATCC	-19
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG-----	-51
125-SC05	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7
125-SC08	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1

Abb. 35: Induzierte *gfp* Mutationen in Regeneraten aus Blattstücken der T₀ Pflanze #125. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Sequenzierungsergebnisse von subklonierten *gfp* Amplifikaten der T₀ Pflanze #125. Im unteren Teil sind die Sequenzierungsergebnisse (entweder direkte Sequenzierung von PCR-Produkten oder Sequenzierung von einzelnen subklonierten *gfp* Amplifikaten) von ausgewählten Regeneraten abgebildet. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen. Homozygot mutierte Pflanzen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

3.3.9 Analyse von Nachkommen somatischer Klone der T₀ Pflanze #125

Um zu untersuchen, ob die vegetativ erhaltenen Mutationen der T₀ Pflanze #125 in die nächste Generation übertragen werden können, wurden 10-15 Nachkommen von ausgewählten Regeneraten untersucht (#125-SC01, #125-SC02, #125-SC03, #125-SC05). Wie schon bei der Analyse der Nachkommen von selbstbestäubten Pflanzen und regenerierten Pflanzen aus der embryogenen Pollenkultur, wurde auch hier zunächst ein T7E1 Assay durchgeführt. Pflanzen mit einem T7E1 negativen Ergebnis wurden direkt sequenziert, während die *gfp* Amplifikate von jeweils zwei Nachkommen, die T7E1 positiv waren, subkloniert und einzelne Klone sequenziert wurden, um die vorliegenden Mutationen zu charakterisieren. Im nachfolgenden sind die Ergebnisse aus der Nachkommenschaftsanalyse von den vier ausgewählten Pflanzen, die durch vegetative Vermehrung generiert wurden, aufgeführt.

3.3.9.1 Nachkommenschaftsanalyse von Mutante #125-SC01

Bei der Pflanze #125-SC01 wurden mehrere *gfp* Mutationen identifiziert, von denen die maternale 8 bp Deletion unter den Nachkommen wiedergefunden werden konnte, während die kombinierte Mutation aus Deletion und Insertion nicht detektiert wurde (Abb. 36). Zwei weitere Mutationen

konnten darüber hinaus identifiziert werden. Von den 15 untersuchten Nachkommen beherbergten sechs mehrere *gfp* Varianten, während acht homozygot für eine *gfp* Mutation waren (darunter auch die 8 bp Deletion, Pflanze #125-SC01-04). Lediglich eine T₁ Pflanze hatte den *gfp* WT genetisch fixiert. Die Präsenz von *Cas9* und gRNA wurde mittels PCR untersucht und zeigte, dass drei der 15 T₁ Individuen transgenfrei waren; darunter befanden sich zwei homozygote Mutanten und eine heterozygote (Anhang Tab. A 11).

3.3.9.2 Nachkommenschaftsanalyse von Mutanten #125-SC02 und #125-SC03

Die Pflanzen #125-SC02 und #125-SC03 wurden nach den Ergebnissen von T7E1 Assay und der Sequenzierung des jeweiligen PCR-Produktes als homozygot für die 1 bp Insertion klassifiziert (Abb. 36a). Zur Überprüfung der Zygotie der *gfp* Mutation wurden jeweils zehn Nachkommen untersucht. In allen Nachkommen der Pflanze #125-SC02 lag die maternale 1 bp Insertion in genetisch fixiertem Zustand vor (Abb. 36b). Im Gegensatz dazu konnte lediglich bei sechs Nachkommen der Pflanze #125-SC03 die 1 bp Insertion detektiert werden (Abb. 36b), während bei den restlichen vier Pflanzen die *gfp* Zielregion trotz wiederholter PCR nicht amplifiziert werden konnte. Dies weist darauf hin, dass in diesen Pflanzen eine Mutation vorhanden war, die die Bindesequenz von einem Primer veränderte oder eliminierte, wodurch die *gfp* Zielregion nicht amplifiziert werden konnte. Da dies bei vier Nachkommen auftrat, ist davon auszugehen, dass diese Mutation bereits in der Mutterpflanze vorhanden war, aber unentdeckt blieb da eine Amplifikation nicht möglich war.

Die Präsenz von *Cas9* und gRNA konnte in acht Nachkommen der Pflanze #125-SC03 nachgewiesen werden (Anhang Tab. A 11). Unter den beiden transgenfreien Pflanzen war eine homozygote Mutante und eine Mutante dessen *gfp* nicht mehr amplifizierbar war. Unter den Nachkommen der Pflanze #125-SC02 waren drei genetisch veränderte, transgenfreie Individuen vertreten (Anhang Tab. A 11).

3.3.9.3 Nachkommenschaftsanalyse von Mutante #125-SC05

Zehn Nachkommen der Pflanze #125-SC05 wurden untersucht, mit dem Ergebnis, dass vier davon für eine *gfp* Mutation homozygot waren, während die restlichen sechs mehrere *gfp* Varianten enthielten. Unter den homozygoten Mutanten wurde neben einer 1 bp Deletion auch die maternale 7 bp Deletion identifiziert (Abb. 36b). In zwei der heterozygoten/chimären Pflanzen konnten ebenfalls die 1 bp und 7 bp Deletionen gefunden werden, während die *gfp* WT Sequenz nicht detektiert wurde. *Cas9* und gRNA wurden in neun von den zehn Nachkommen nachgewiesen (Anhang Tab. A 11); bei der transgenfreien Pflanze handelte es sich um eine homozygote Mutante (#125-SC05-06).

a**T₀ Generation**

<i>gfp</i> WT	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	
125	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1

vegetative Erhaltung

125-SC01	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-8
	-----TTCTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-92/+2
125-SC02	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
125-SC03	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
125-SC05	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7

b**T₁ Generation**

Nachkommen der Pflanze #125-SC01

125-SC01-03	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1*
125-SC01-04	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-8*
125-SC01-07	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-5
125-SC01-11	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	±0
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-8

Nachkommen der Pflanze #125-SC02

125-SC02-03	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
-------------	--	-----

Nachkommen der Pflanze #125-SC03

125-SC03-02	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC	+1*
-------------	--	-----

Nachkommen der Pflanze #125-SC05

125-SC05-01	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7
125-SC05-02	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1*
125-SC05-04	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCC	-1
	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7
125-SC05-06	GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG-----TTCAAGGAGGACGGCAACATCC	-7*

Abb. 36: Vererbung von induzierten *gfp* Mutationen ausgewählter Regenerate von T₀ Pflanze #125. a) Sequenzierungsergebnisse von subklonierten *gfp* Amplifikaten der T₀ Pflanze #125 sowie von ausgewählten Regeneraten dieser. b) Detektierte Mutationen (entweder durch direkte Sequenzierung von PCR-Produkten oder Sequenzierung von einzelnen, subklonierten *gfp* Amplifikaten) in ausgewählten Nachkommen der Regenerate #125-SC01, #125-SC02, #125-SC03 und #125-SC05. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen. Homozygot mutierte Pflanzen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

3.3.10 Vielfalt, Muster und Häufigkeit von gRNA/Cas9-induzierten *gfp* Mutationen

Um die Vielfalt von induzierten *gfp* Mutationen und die Häufigkeit von unabhängig entstandenen genetischen Veränderungen zu untersuchen, wurden alle Daten, die von verschiedenem Pflanzenmaterial gewonnen wurden (T₀ Pflanzen, T₁ und T₂ Nachkommen von selbstbestäubten T₀ Pflanzen, Regenerate sowohl aus der embryogenen Pollenkultur als auch von den Blattsegmenten und deren Nachkommen), zusammengefasst. Insgesamt gab es 59 unabhängige Mutationsereignisse in der *gfp* Sequenz, von denen 49 (83,0 %) Deletionen waren, fünf (8,5 %) Insertionen, zwei Substitutionen von 1 bzw. 2 bp (3,4 %) und drei kombinierte Mutationen (5,1 %), bei denen Basenpaare entfernt sowie neue hinzugefügt worden waren. Dreiviertel (77,6 %) aller Deletionen

waren kleiner als 10 bp, die größte war 228 bp lang; bis auf eine Ausnahme (Pflanze #125-14-14) wurden ausschließlich 1 bp große Insertionen gefunden. Insgesamt beinhalteten 44,1 % aller Mutationen nur ein einzelnes Basenpaar (Abb. 37).

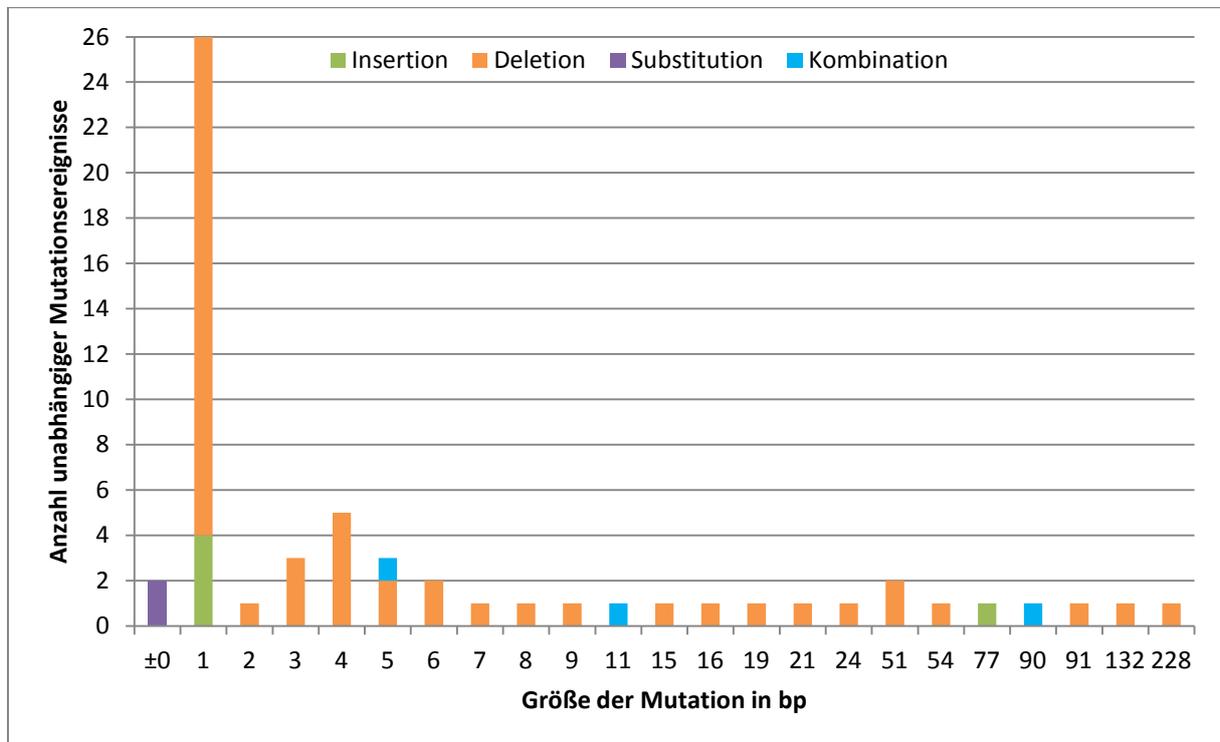


Abb. 37: Die Vielfalt von induzierten *gfp* Mutationen und die Häufigkeit der verschiedenen Mutationstypen und -längen. Die x-Achse zeigt die Größe der Sequenzveränderungen in bp und die y-Achse deren Häufigkeit. Die x-Achse entspricht oberhalb des Wertes 9 keinem linearen Anstieg sondern repräsentiert lediglich die tatsächlich aufgetretenen Mutationsgrößen. Identische Mutationen wurden nur berücksichtigt, wenn sie nachweislich durch unabhängige Ereignisse entstanden sind.

Die Häufigkeit mit der Deletionen oder Insertionen an einer bestimmten Position der Zielsequenz bzw. auch in der umliegenden Sequenz auftreten, wurde untersucht. Dafür wurde der zuvor erwähnte Datensatz verwendet und die Anzahl unabhängiger Mutationsereignisse für jede Position einer 151 bp langen Nukleotidsequenz ermittelt, die die *gfp* Zielsequenz enthält. Dieser Sequenzabschnitt wurde ausgewählt, um die Ausdehnung der großen Deletionen zu veranschaulichen. Da sowohl Substitutionen als auch kombinierte Mutationen Deletionen und Insertionen umfassen, wurden diese Mutationstypen nicht separat aufgeführt, sondern bei der jeweiligen Kategorie zusammengefasst berücksichtigt. Die Untersuchung von insgesamt 59 unabhängigen Mutationsereignissen ergab, dass Deletionen an allen Positionen der 151 bp Sequenz vorkamen, während Insertionen ab etwa der Hälfte der Sequenz auftraten (Abb. 38); der Großteil der Insertionen beschränkte sich jedoch auf drei Positionen. Das vierte Nukleotid in 5'-Richtung von dem PAM wurde am häufigsten verändert, wobei in 72,9 % der Fälle das Thymin entfernt und in 10,2 % ein zusätzliches Thymin an dieser Stelle eingefügt wurde.

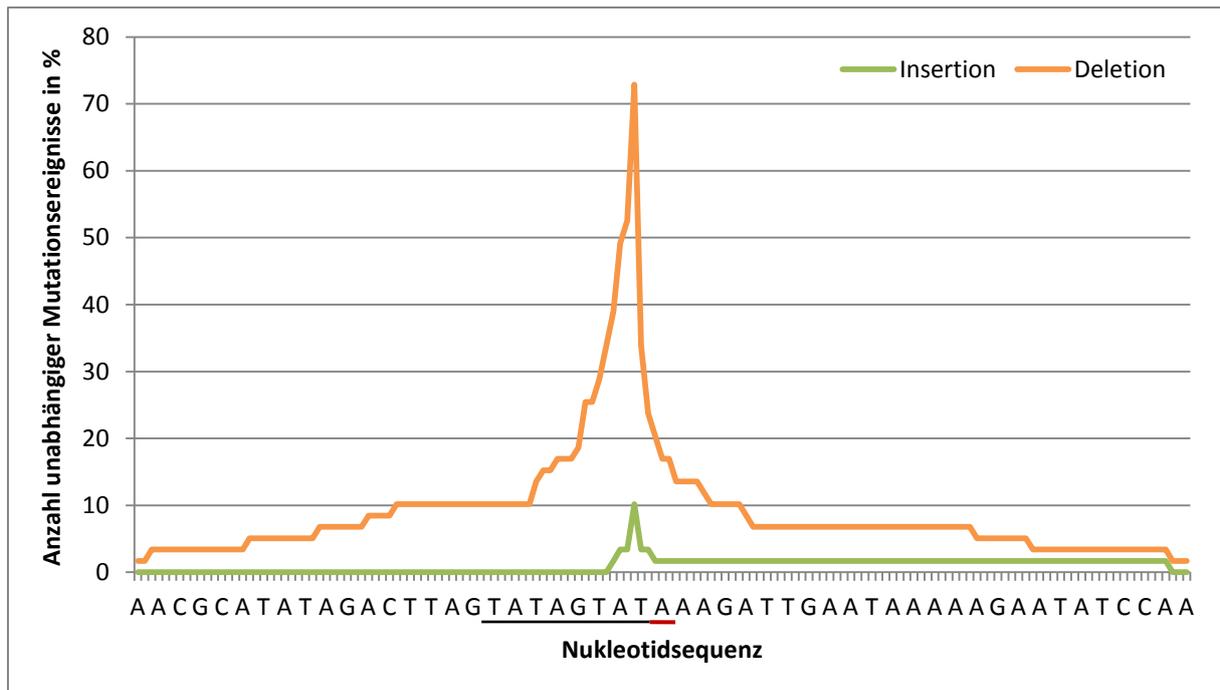


Abb. 38: Häufigkeit von Deletionen und Insertionen an bestimmten Positionen der *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 Zielsequenz und umliegender Sequenzabschnitte. Die x-Achse zeigt die untersuchte 151 bp lange Nukleotidsequenz, wobei nur jedes dritte Nukleotid beschriftet ist. An der y-Achse ist die Anzahl unabhängiger Mutationsereignisse in Prozent [%] angegeben. Identische Mutationen wurden berücksichtigt, wenn sie durch unabhängige Ereignisse entstanden sind. Die schwarz unterstrichene Sequenz repräsentiert den Protospacer, die in rot das Protospacer-Adjacent Motif (PAM).

3.3.11 Einfluss von gRNA/Cas9-induzierten *gfp* Mutationen ohne Veränderung des Leserahmens auf die GFP Fluoreszenz

Mutationen, die nicht zu einer Verschiebung des translationalen Leserahmens im *gfp* führten, kamen mit einem Anteil von 28,8% sowohl in der T_0 Generation als auch in den nachfolgenden Generationen vor. Darunter befanden sich viele der Deletionsmutanten, die 1 bp und 2 bp Substitutionen und die kombinierte Mutation von 92 bp Deletion/2 bp Insertion (Pflanze #125-SC01). Solche Mutationen sind deshalb besonders interessant, da sie nicht zwangsläufig zu einem Knock-out der Genfunktion führen, sondern auch zu Veränderungen. Um zu untersuchen welchen Einfluss die identifizierten *gfp* Mutationen ohne Leserahmenverschiebung auf die GFP Fluoreszenz haben, wurden Blattstücke von homozygoten Mutanten mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops Zeiss LSM780 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert (siehe Kapitel 2.2.28). Fünf *gfp* Mutationen, welche in homozygotem Zustand vorlagen, wurden dafür ausgewählt, darunter auch der 2 bp Austausch (siehe Anhang Abb. A 5). Die Visualisierung der GFP Fluoreszenz erfolgte mit einer 488 nm Laserlinie zur Anregung in Kombination mit einem 491-530 nm Bandpassfilter für die emittierte Strahlung.

In Abb. 39a ist die mikroskopische Aufnahme von einer *gfp* WT Pflanze gezeigt, welche als Positivkontrolle für die Analyse der GFP Fluoreszenz verwendet wurde. Die Analyse der Mutanten ohne Leserahmenverschiebung ergab, dass die Mutanten F130G (Pflanze #125-P58-01) sowie $\Delta 18aa/N135D$ (#254-08-12) und $\Delta 76aa$ (#125-P61-05) keine GFP Fluoreszenz erzeugten (Abb. 39b, e,

f). Im Vergleich dazu konnte in den beiden Mutanten Δ D129 (#125-14-01) und Δ D129/F130V (#126-40-06; Abb. 39c, d) GFP Fluoreszenz detektiert werden. Im Vergleich zum *gfp* WT, war diese jedoch wesentlich reduziert. Zwei Mutanten die eine 1 bp Insertion (#125-SC3-02) bzw. Deletion (#126-05-04) beherbergten, welche eine Verschiebung des translationalen Leserahmens sowie ein vorzeitiges Stopcodon erzeugten, wurden neben dem *N. tabacum* WT als Negativkontrollen verwendet (Abb. 39g, h, i).

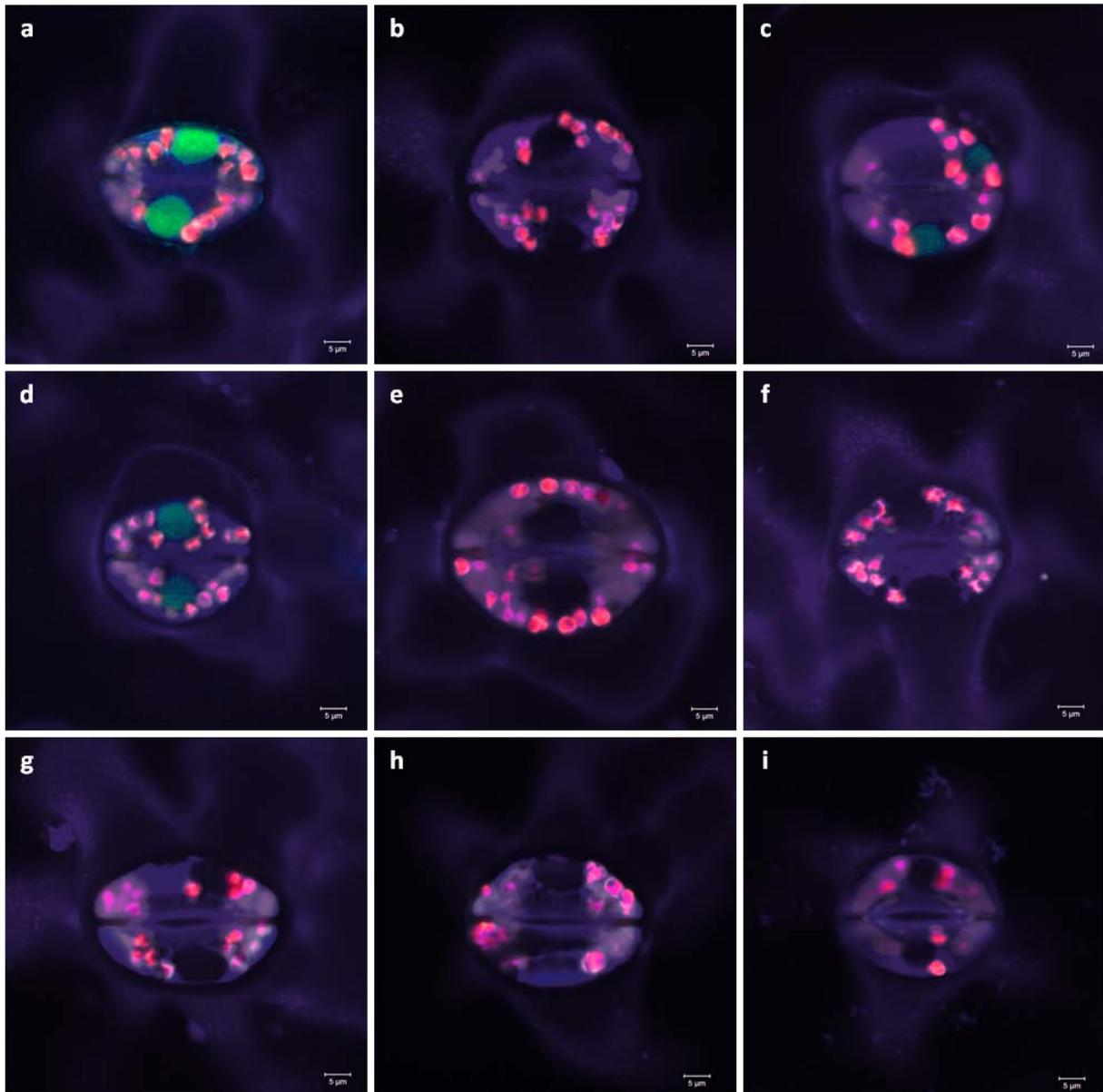


Abb. 39: GFP Fluoreszenz in ausgewählten Pflanzen mit gRNA/Cas9-induzierten *gfp* Mutationen. a) *gfp* WT Pflanze (Positivkontrolle), b) Mutante F130G, c) und d) Mutanten Δ D129 und Δ D129/F130V mit reduzierter Fluoreszenz, e) Mutante Δ 18aa/N135D, f) Mutante Δ 76aa, g) und h) Knock-out Mutanten durch Leserahmenverschiebung, i) *N. tabacum* WT Pflanze (Negativkontrolle); Balken 5 μ m.

3.4 Erzeugung von *NbCENH3* Mutationen unter Verwendung der gRNA-vermittelten Cas9 Plattform

3.4.1 Klonierung *NbCENH3*-spezifischer gRNA/Cas9 Konstrukte

Die *NbCENH3*-spezifischen gRNA/Cas9 Konstrukte wurden ebenfalls unter Verwendung des Gateway® kompatiblen gRNA/Cas9 Vektorsystems (Fauser et al. 2014), wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, kloniert. Die vier Zielsequenzen wurden mit Hilfe des Internetportals CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>) identifiziert, wobei die Zielsequenzen von *NbCENH3*-gRNA1 und -gRNA2 sich im ersten Exon des Gens befanden (Abb. 40a). *NbCENH3*-gRNA1 wurde so ausgewählt, dass die Zielsequenz mit der der *NbCENH3*-TALENs überlappt. Im Gegensatz dazu wurde die *NbCENH3*-gRNA2 aufgrund der sehr guten Werte im Vorhersage-Tool gewählt. *NbCENH3*-gRNA3 band im dritten und gRNA4 im fünften Exon wo sich die sogenannte CAT-Domäne befindet (siehe Kapitel 1.7.1). Alle vier ausgewählten Zielregionen befanden sich auf dem Antisense-Strang von *NbCENH3* (Abb. 40b).

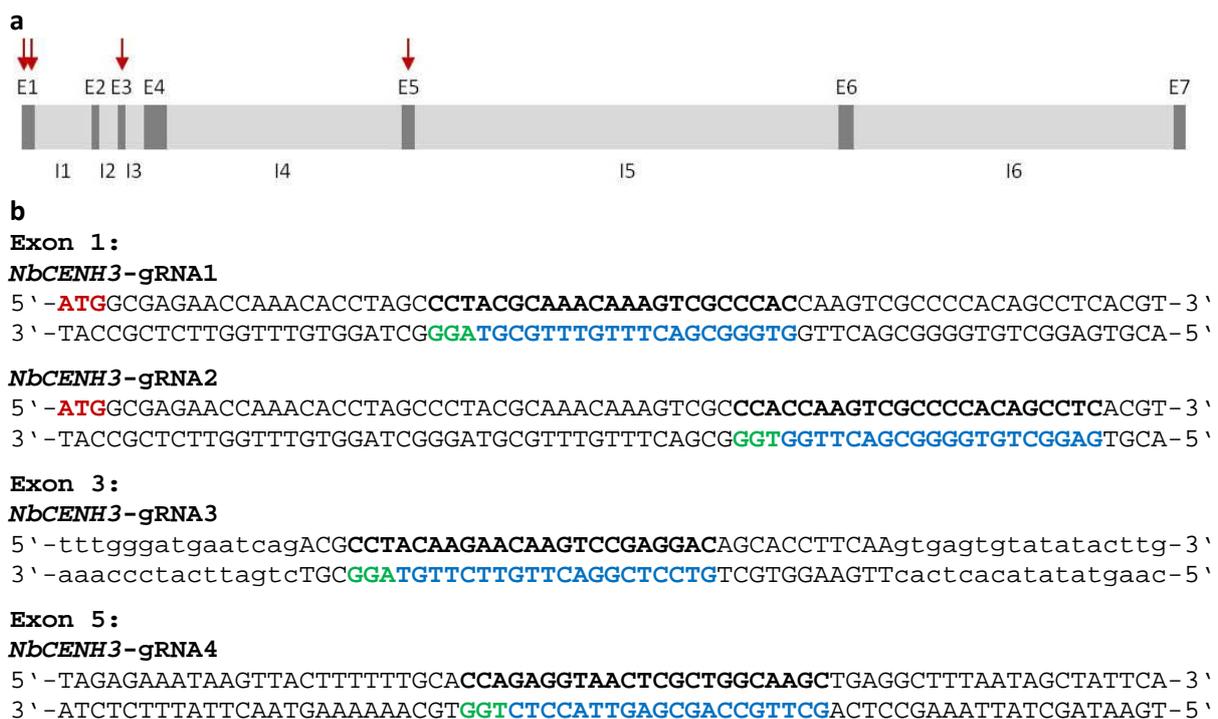


Abb. 40: Übersicht über die vier Zielsequenzen der *NbCENH3*-spezifischen gRNA-vermittelten Cas9. a) Intron-Exon-Struktur des *NbCENH3* mit Markierungen (dunkelrote Pfeile) für die Zielregionen der *NbCENH3*-spezifischen gRNAs. E1-E7: Exon 1 bis Exon 7; I1-I6: Intron 1 bis Intron 6. b) Zielsequenzen der einzelnen *NbCENH3*-spezifischen gRNAs in doppelsträngiger Darstellung. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Die entsprechenden Sequenzen auf dem Sense-Strang sind fett geschrieben; das Startcodon „ATG“ ist dunkelrot hervorgehoben. Sequenzen in Großbuchstaben repräsentieren Exons, während Kleinbuchstaben die Introns darstellen.

Die Zielsequenzen von *NbCENH3*-gRNA1 bis -gRNA3 befinden sich alle im N-Terminus des nativen *NbCENH3*, um Mutationen dort zu erzeugen wo das Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit einen vollständigen Funktionsverlust aufgrund von Leserahmenverschiebungen erleidet. Es war zudem wichtig, dass die ausgewählten Zielsequenzen nicht in den für die Komplementationskonstrukte

Zwischenvektor pNB1 (GenBank: KU705395) kloniert wurde. Die Sequenz der daraus resultierenden Vektoren pTARGET-CENH3 2 und pTARGET-CENH3 3 wurde durch Sequenzierung überprüft und die Nicht-Funktionalität des *yfp* in einem Kontrollexperiment bestätigt. Dafür wurden *N. benthamiana* WT Blätter mit einem der Testvektoren und der *mCherry* Expressionskassette co-bombardiert und die fluoreszierenden Zellen ausgezählt. Bei beiden Testvektoren konnten rote, aber keine gelb fluoreszierenden Zellen gefunden werden (Tab. 16). Der Testvektor pTARGET-CENH3 1, der bereits für die Validierung der *NbCENH3*-spezifischen TALENs verwendet wurde (siehe Kapitel 3.2.3), konnte auch für die *NbCENH3*-spezifische gRNA1 und 2 genutzt werden, da die Zielsequenzen dieser beiden gRNAs mit der der TALENs überlappen.

Anschließend wurden pro gRNA drei Experimente durchgeführt, bei dem jeweils die *mCherry* Expressionskassette, ein Testvektor und das entsprechende gRNA/Cas9 Konstrukt zur Co-Transformation verwendet wurden; für die *NbCENH3*-spezifischen gRNAs wurden die in Tab. 16 dargestellten Werte ermittelt.

Tab. 16: Effizienz der *NbCENH3*-spezifischen gRNA/Cas9 Konstrukte in biolistisch transformierten Tabakblättern.

Zielgen	Art der Endonuklease	verwendete Konstrukte	Experiment	YFP Zellen	mCherry Zellen	YFP/mCherry Zellen (in %)
<i>NbCENH3</i> Exon1	gRNA/Cas9	pTARGET-CENH3 1 + <i>NbCENH3</i> -gRNA1	1	62	311	19,9
			2	11	81	13,1
			3	57	207	27,5
			∅	43 ± 23	200 ± 94	20,2
<i>NbCENH3</i> Exon1	gRNA/Cas9	pTARGET-CENH3 1 + <i>NbCENH3</i> -gRNA2	1	7	175	4,0
			2	2	412	0,5
			3	4	287	1,4
			∅	4 ± 2	291 ± 97	2,0
<i>NbCENH3</i> Exon3	gRNA/Cas9	pTARGET-CENH3 2 + <i>NbCENH3</i> -gRNA3	1	53	471	11,3
			2	359	1674	21,5
			3	40	141	28,4
			∅	151 ± 147	762 ± 659	20,0
<i>NbCENH3</i> Exon5	gRNA/Cas9	pTARGET-CENH3 3 + <i>NbCENH3</i> -gRNA4	1	12	959	1,3
			2	6	228	2,6
			3	15	929	1,6
			∅	11 ± 4	705 ± 338	1,8
		pTARGET-CENH3 1	1	0	350	0
		pTARGET-CENH3 2	1	0	306	0
		pTARGET-CENH3 3	1	0	270	0

3.4.3 Co-Transformation von *N. benthamiana* mit *NbCENH3*-spezifischer gRNA/Cas9 Endonuklease und CENH3-Derivaten zur Komplementation

Bei den Co-Transformationsexperimenten wurde eines der *NbCENH3*-spezifischen gRNA/Cas9 Konstrukte (pSI34, pSI36 oder pSI38) mit einem der beiden Komplementationskonstrukte (*NbH3*-tailswap oder *AtCENH3*-tailswap) kombiniert. Pro Kombination wurden drei Experimente durchgeführt, wobei insgesamt 120 Blattstücke von *N. benthamiana* WT Pflanzen verwendet wurden. Da die Zielsequenz von *NbCENH3*-gRNA4 sowohl im nativen Gen als auch in den Komplementationskonstrukten vorhanden ist und somit auch die CENH3-Derivate mutiert werden

könnten, wurde dieses gRNA/Cas9 Konstrukt ohne CENH3-Derivat transformiert. Auch hier wurden drei Experimente mit insgesamt 120 Blattstücken durchgeführt. Die Entwicklung von Kallussen sowie erste Ansätze von Regeneraten erfolgten sehr langsam, weshalb die Selektion mittels Bialaphos frühzeitig abgebrochen wurde. Infolgedessen konnten viele Pflanzen pro Kombination regeneriert werden, von denen jedoch ein Großteil keine T-DNA integriert hatte.

Aus den drei Co-Transformationsexperimenten mit der *NbCENH3*-spezifischen gRNA1 und dem NbH3-ts oder AtCENH3-ts Konstrukt wurden insgesamt 33 bzw. 35 Pflanzen regeneriert, von denen jedoch 24 bzw. 25 keine T-DNA integriert hatten. Die PCR-Ergebnisse der restlichen Pflanzen sind in Tab. 17 zusammengefasst. Insgesamt 23 bzw. 29 Pflanzen wurden bei den Co-Transformationen von *NbCENH3*-gRNA2 und NbH3-ts oder AtCENH3-ts generiert, aber lediglich in vier bzw. sieben Pflanzen war die vollständige T-DNA oder Teile davon vorhanden. Bei der Co-Transformation von NbH3-ts oder AtCENH3-ts und der *NbCENH3*-spezifischen gRNA3 wurden 43 bzw. 44 Pflanzen regeneriert. Das *PAT* Gen, Cas9 und/oder gRNA wurden nur in 11 bzw. 24 Regeneraten nachgewiesen. Es konnten 50 Pflanzen aus den Transformationsexperimenten mit der *NbCENH3*-gRNA4 regeneriert werden, aber nur in 16 Regeneraten konnten T-DNA Sequenzen nachgewiesen werden (Tab. 17).

Tab. 17: Übersicht der PCR-Ergebnisse primär transgener Pflanzen aus den Co-Transformationsexperimenten mit Komplementationskonstrukt (NbH3-tailswap, AtCENH3-tailswap) und *NbCENH3*-spezifischer gRNA-vermittelter Cas9.

Bezeichnung Pflanze	PCR <i>PAT</i>	PCR <i>Cas9</i>	PCR gRNA	PCR NbH3-ts	PCR AtCENH3-ts
Co-Transformation NbH3-ts mit <i>NbCENH3</i>-gRNA1					
TP1/1L01	+	+	+	-	-
TP1/1L07	-	+	-	-	-
TP1/1L10	+	+	+	+	-
TP1/1L43	-	+	-	+	-
TP1/1L47	+	+	+	-	-
TP1/1L48	+	+	+	-	-
TP1/1L63	+	-	+	-	-
TP1/1L68	-	-	+	-	-
TP1/1L83	-	+	-	-	-
Co-Transformation NbH3-ts mit <i>NbCENH3</i>-gRNA2					
TP1/2L42	-	+	-	-	-
TP1/2L43	+	-	-	+	-
TP1/2L86	+	-	-	-	-
TP1/2L87	+	+	+	+	-
Co-Transformation NbH3-ts mit <i>NbCENH3</i>-gRNA3					
TP1/3L02	+	-	-	+	-
TP1/3L11	+	+	+	-	-
TP1/3L13	-	+	-	-	-
TP1/3L14	-	+	-	-	-
TP1/3L16	-	+	-	-	-
TP1/3L41	+	+	+	-	-
TP1/3L43	-	-	+	-	-
TP1/3L50	+	-	-	-	-
TP1/3L71	+	+	+	-	-
TP1/3L84	-	+	-	-	-
TP1/3L86	-	+	-	-	-
Co-Transformation AtCENH3-ts mit <i>NbCENH3</i>-gRNA1					
TP1/4L41	+	+	+	-	+
TP1/4L42	-	-	+	-	-
TP1/4L43	+	+	+	-	+

Bezeichnung Pflanze	PCR <i>PAT</i>	PCR <i>Cas9</i>	PCR gRNA	PCR NbH3-ts	PCR AtCENH3-ts
TP1/4L44	-	+	+	-	-
TP1/4L47	-	-	+	-	-
TP1/4L48	-	-	+	-	-
TP1/4L61	+	-	-	-	-
TP1/4L63	-	+	-	-	-
TP1/4L64	+	-	-	-	-
TP1/4L85	-	-	+	-	-
Co-Transformation AtCENH3-ts mit <i>NbCENH3</i>-gRNA2					
TP1/5L06	+	+	+	-	+
TP1/5L08	-	+	-	-	-
TP1/5L41	+	-	-	-	-
TP1/5L46	+	-	-	-	-
TP1/5L61	+	+	-	-	+
TP1/5L64	+	+	-	-	+
TP1/5L67	-	+	-	-	-
Co-Transformation AtCENH3-ts mit <i>NbCENH3</i>-gRNA3					
TP1/6L13	+	+	+	-	-
TP1/6L14	+	+	+	-	+
TP1/6L15	-	-	+	-	+
TP1/6L16	-	+	+	-	+
TP1/6L17	+	-	+	-	-
TP1/6L21	-	+	+	-	-
TP1/6L22	+	+	+	-	-
TP1/6L23	-	+	+	-	-
TP1/6L24	-	-	+	-	-
TP1/6L41	+	-	+	-	-
TP1/6L42	-	-	+	-	-
TP1/6L43	-	-	+	-	-
TP1/6L44	+	+	+	-	-
TP1/6L45	-	-	+	-	-
TP1/6L46	-	-	+	-	+
TP1/6L47	-	-	+	-	-
TP1/6L48	-	-	+	-	-
TP1/6L49	+	+	+	-	-
TP1/6L50	-	+	-	-	-
TP1/6L65	-	+	-	-	-
TP1/6L66	-	+	+	-	-
TP1/6L68	-	-	+	-	-
TP1/6L69	+	-	-	-	+
TP1/6L73	-	+	-	-	-
Transformation <i>NbCENH3</i>-gRNA4					
TP1/7L17	+	+	+	/	/
TP1/7L18	+	+	+	/	/
TP1/7L21	+	-	-	/	/
TP1/7L25	+	+	+	/	/
TP1/7L27	-	-	+	/	/
TP1/7L28	+	+	-	/	/
TP1/7L30	+	+	-	/	/
TP1/7L31	+	+	-	/	/
TP1/7L32	+	+	+	/	/
TP1/7L41	+	+	+	/	/
TP1/7L42	+	+	+	/	/
TP1/7L43	+	+	+	/	/
TP1/7L46	+	-	-	/	/
TP1/7L53	+	+	+	/	/
TP1/7L54	+	+	+	/	/
TP1/7L55	+	-	+	/	/

3.4.4 Analyse der *NbCENH3* Zielregionen in primär transgenen Pflanzen

Regenerierte Pflanzen aus den Co-Transformationsexperimenten, welche sowohl *Cas9* als auch die jeweilige gRNA integriert hatten, wurden hinsichtlich induzierter Mutationen untersucht. Dafür wurde die entsprechende Zielsequenz aus der genomischen DNA amplifiziert und das aufgereinigte PCR-Produkt für den T7E1 Assay verwendet. T7E1 negative Proben wurden direkt sequenziert, um eventuell falsch-negative Ergebnisse festzustellen. Die PCR-Produkte von T7E1 positiven Pflanzen wurden subkloniert und 11-20 einzelne Klone sequenziert, um die Mutationen zu charakterisieren.

3.4.4.1 Analyse von Regeneraten aus der Co-Transformation mit *NbCENH3*-gRNA1

Aus den Co-Transformationsexperimenten von *NbH3*-ts und *NbCENH3*-spezifischer gRNA1 konnten vier Pflanzen regeneriert werden, die *Cas9* und gRNA beherbergten. Der T7E1 Assay bzw. die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte ergab, dass drei der vier Pflanzen mutiert waren, wobei keine der Mutanten das *NbH3*-ts Konstrukt integriert hatte. Insertionen von 1 bp wurden in allen Pflanzen gefunden, darunter drei verschiedene innerhalb einer Pflanze (#TP1/1L01; Abb. 42a, Anhang Tab. A 14). Des Weiteren konnten Deletionen im Bereich von 1 bp bis 55 bp identifiziert werden. Alle drei mutierten Pflanzen beinhalteten neben der *NbCENH3* WT Sequenz zwei oder mehr mutierte *Nbcenh3* Sequenzen. Anzumerken ist, dass es sich bei den Pflanzen #TP1/1L47 und #TP1/1L48 um Geschwisterpflanzen handelte.

Drei Pflanzen wurden aus der Co-Transformation von *AtCENH3*-ts und *NbCENH3*-gRNA1 generiert von denen zwei, neben *Cas9* und gRNA, auch das Komplementationskonstrukt integriert hatten. In diesen beiden Pflanzen, #TP1/4L41 und #TP1/4L43, konnten Mutationen detektiert werden (Abb. 42b, Anhang Tab. A 14), die mittels Sanger-Sequenzierung charakterisiert wurden. Es handelte sich hierbei ausschließlich um 1 bp Insertionen; bei einer Pflanze kam neben dem *NbCENH3* WT Allel nur ein mutiertes Allel vor (#TP1/4L41), während bei der zweiten Pflanze zwei mutierte *Nbcenh3* Sequenzen gefunden wurden (#TP1/4L43).

3.4.4.2 Analyse von Regeneraten aus der Co-Transformation mit *NbCENH3*-gRNA2

Sowohl bei der Co-Transformation von *NbH3*-ts mit der *NbCENH3*-spezifischen gRNA2 als auch bei der Kombination von *AtCENH3*-ts Konstrukt und *NbCENH3*-gRNA2 konnte jeweils nur eine Pflanze regeneriert werden, die *Cas9* und gRNA integriert hatte. Aber auch das jeweilige Komplementationskonstrukt konnte nachgewiesen werden (siehe Anhang Tab. A 14). Bei einer der beiden Pflanzen (#TP1/2L87) wurde neben der *NbCENH3* WT Sequenz eine mutierte *Nbcenh3* Sequenz gefunden; hierbei handelte es sich um eine 12 bp Deletion (Abb. 42c, Anhang Tab. A 14).

a

<i>CENH3</i> WT	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT		
TP1/1L01	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	±0	(9x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1a	(1x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1b	(1x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1c	(3x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	-1	(1x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	-18	(1x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	-55	(1x)
TP1/1L47	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	±0	(14x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1b	(4x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1c	(1x)
TP1/1L48	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	±0	(12x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1b	(5x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1c	(1x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	-4	(1x)

b

<i>CENH3</i> WT	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT		
TP1/4L41	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	±0	(2x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1c	(16x)
TP1/4L43	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	±0	(18x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1a	(1x)
	TGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGCCTAGGCTAGGTGTTTGGTT	+1b	(1x)

c

<i>CENH3</i> WT	ACTAACCAGAACGTGAGGCTGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGGC		
TP1/2L87	ACTAACCAGAACGTGAGGCTGTGGGGCGACTTGGTGGGCGACTTTGTTTGGC	±0	(2x)
	ACTAACCAGAACGTGAGGCTGTGGGGCGACTT-----TGTGTTGGC	-12	(14x)

Abb. 42: Sequenzierungsergebnisse von primär transgenen Pflanzen aus den Co-Transformationsexperimenten von NbH3-tailswap oder AtCENH3-tailswap mit NbCENH3-gRNA1 und -gRNA2. a) Detektierte Mutationen von Regeneraten aus der Co-Transformation von NbH3-ts und NbCENH3-gRNA1 b) Sequenzierungsergebnisse primär transgener Pflanzen aus der Co-Transformation von AtCENH3-ts mit der NbCENH3-gRNA1. c) Detektierte Mutation in einem Regenerat aus der Co-Transformation von NbH3-ts und NbCENH3-gRNA2. Die PCR-Produkte von T7E1 positiven Pflanzen wurden subkloniert und einzelne Amplifikate sequenziert. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) sowie die Anzahl an Kolonien mit der entsprechenden NbCENH3 Sequenz befinden sich auf der rechten Seite der Sequenzen.

3.4.4.3 Analyse von Regeneraten aus der Co-Transformation mit NbCENH3-gRNA3

Insgesamt drei Pflanzen konnten aus den Co-Transformationsexperimenten von NbH3-ts und NbCENH3-gRNA3 regeneriert werden, die sowohl die *Cas9* als auch die gRNA integriert hatten (Anhang Tab. A 14). Mutationen wurden in einer der drei Pflanzen detektiert und mittels Sanger-Sequenzierung konnten neben der NbCENH3 WT Sequenz zwei verschiedene 6 bp Deletionen charakterisiert werden (Abb. 43a). Das Komplementationskonstrukt wurde in dieser Mutante nicht nachgewiesen.

Bei der Co-Transformation von AtCENH3-ts und NbCENH3-spezifischer gRNA3 wurden neun Regenerate erzeugt, die *Cas9* und gRNA integriert hatten (Anhang Tab. A 14), aber nur in zwei Pflanzen wurden Mutationen detektiert. Die Charakterisierung dieser mittels Sanger-Sequenzierung von Einzelkolonien zeigte, dass in beiden Pflanzen die gleiche 1 bp Substitution vorlag (Abb. 43b). Keine der beiden Mutanten hatte das AtCENH3-ts Konstrukt integriert.

a

<i>CENH3</i> WT	CACTTGAAGGTGCTGTCCTCGGACTTGTTCCTTGTAGGCGTCTGATTCATCCC	
TP1/3L11	CACTTGAAGGTGCTGTCCTCGGACTTGTTCCTTGTAGGCGTCTGATTCATCCC	±0 (13x)
	CACTTGAAGGTGCTGTCCTCGGACTTGT-----AGGCGTCTGATTCATCCC	-6 (6x)
	CACTTGAAGGTGCTGTCCTCGGACTTGTTC-----GCGTCTGATTCATCCC	-6 (1x)

b

<i>CENH3</i> WT	CACTTGAAGGTGCTGTCCTCGGACTTGTTCCTTGTAGGCGTCTGATTCATCCC	
TP1/6L13	CACTTGAAGGTGCTGTCCTCGGACTTGTTCCTTGTAGGCGTCTGATTCATCCC	±0 (10x)
	CACTTGAAGGTGCTGTCCTCGGACTTGTTCCTGTAGGCGTCTGATTCATCCC	-1/+1 (1x)
TP1/6L16	CACTTGAAGGTGCTGTCCTCGGACTTGTTCCTTGTAGGCGTCTGATTCATCCC	±0 (12x)
	CACTTGAAGGTGCTGTCCTCGGACTTGTTCCTGTAGGCGTCTGATTCATCCC	-1/+1 (2x)

Abb. 43: Sequenzierungsergebnisse von primär transgenen Pflanzen aus den Co-Transformationsexperimenten von NbH3-tailswap oder AtCENH3-tailswap mit NbCENH3-gRNA3. a) Detektierte Mutationen von Regeneraten aus der Co-Transformation von NbH3-ts und NbCENH3-gRNA3 b) Sequenzierungsergebnisse primär transgener Pflanzen aus der Co-Transformation von AtCENH3-ts mit der NbCENH3-gRNA3. Die PCR-Produkte von T7E1 positiven Pflanzen wurden subkloniert und einzelne Amplifikate sequenziert. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün das *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Anzahl der veränderten Nukleotide (in bp) sowie die Anzahl an Kolonien mit der entsprechenden NbCENH3 Sequenz befinden sich auf der rechten Seite der Sequenzen.

3.4.4.4 Analyse von Regeneraten aus der Transformation mit NbCENH3-gRNA4

Es wurden insgesamt neun Pflanzen aus den Transformationsexperimenten mit der NbCENH3-spezifischen gRNA4 regeneriert, die sowohl die *Cas9* als auch die gRNA integriert hatten (siehe Anhang Tab. A 14). Von diesen neun Pflanzen wurde die Zielregion amplifiziert und als Matrize für den T7E1 Assay verwendet, wobei keine der neun Pflanzen einen positiven Befund hatte. Die PCR-Produkte von allen T₀ Pflanzen wurden direkt sequenziert um falsch-negative Ergebnisse des T7E1 Assays auszuschließen. Die Sequenzierungsergebnisse bestätigten in diesem Fall jedoch das Resultat des Assays (Anhang Tab. A 14).

3.4.4.5 Phänotyp von ausgewählten *cenh3* Mutanten

Fünf *Nbcenh3* Mutanten (#TP1/1L01, #TP1/1L47, #TP1/1L48, #TP1/4L41 und #TP1/4L43) zeigten phänotypische Veränderungen, welche sich im Vergleich zu NbCENH3 WT Pflanzen durch einen kleineren Wuchs, insbesondere während der späteren Entwicklung zeigten (Abb. 44a, b). Des Weiteren waren die Blätter der Mutanten im Vergleich zum WT kleiner und gekräuselt und hatten eine dunklere, mattgrüne Farbe. Bei der weiteren Entwicklung zeigten sich Unregelmäßigkeiten im Blütenbau sowie bei einigen Blüten eine partielle oder vollständige männliche Sterilität (Abb. 44c bis h); dennoch konnten einige Samen gewonnen werden. Die Mutanten #TP1/4L41 und #TP1/4L43 wurden aus den Co-Transformationsexperimenten mit dem AtCENH3-ts Konstrukt und der NbCENH3-gRNA1 regeneriert, während die anderen drei Mutanten aus Transformationen mit dem NbH3-ts Komplementationskonstrukt und der NbCENH3-spezifischen gRNA1 stammten. Bei den Mutanten #TP1/1L47 und #TP1/1L48 handelte es sich um Schwesterpflanzen die vom gleichen Kallus stammten, während Mutante #TP1/1L01 aus einem anderen Transformationsexperiment generiert wurde. Die restlichen vier *Nbcenh3* Mutanten (#TP1/2L87, #TP1/3L11, #TP1/6L13 und #TP1/6L16) waren nicht vom NbCENH3 WT unterscheidbar.

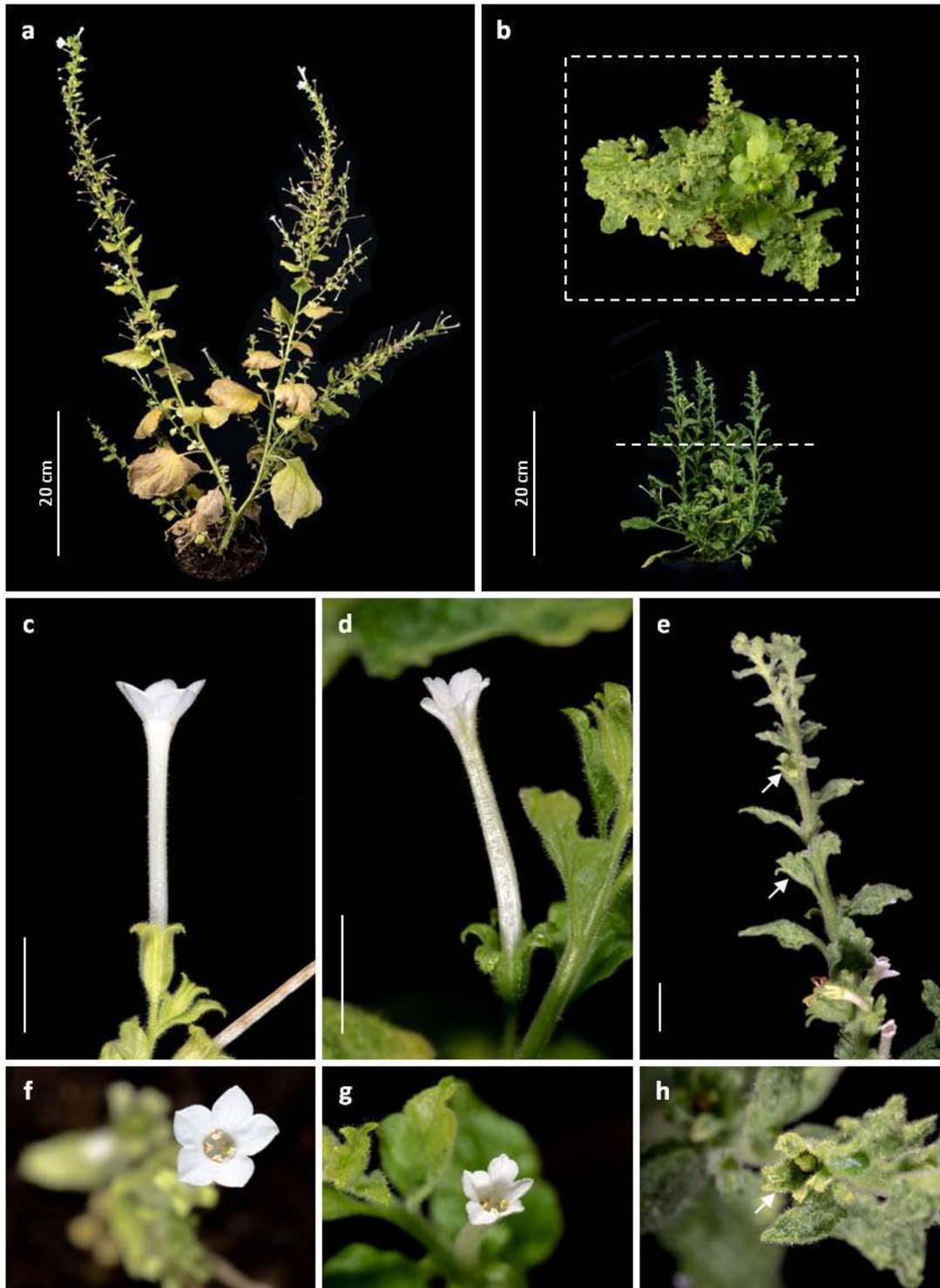


Abb. 44: Phänotyp von zwei ausgewählten *Nbcenh3* Mutanten im Vergleich zu einer *NbcENH3* Wildtyp Pflanze. Aufnahmen von Pflanzen vier Monate nach dem Transfer ins Gewächshaus. Gesamtansicht von *NbcENH3* WT Pflanze #TP1/6L66 (a) und *Nbcenh3* Mutante #TP1/1L47 (b). Die umrahmte Aufnahme zeigt die Draufsicht der Mutante. c, f) Blüte von *NbcENH3* WT Pflanze #TP1/6L66, d, g) Blüte von *Nbcenh3* Mutante #TP1/1L47, e, h) Blüte von *NbcENH3* Mutante #TP1/4L41. Unbeschriftete Balken entsprechen jeweils 1 cm; weiße Pfeile weisen auf anormale Blüten hin.

4 Diskussion

4.1 Anwendung der TALEN Plattform in zwei *Nicotiana* Arten

Die Etablierung der TALEN Plattform in *N. tabacum* mit *gfp* als Zielgen war im Rahmen der vorliegenden Studie zunächst nicht erfolgreich, da in den primär transgenen Pflanzen keine induzierten Mutationen detektiert wurden. Zhang *et al.* (2013) erreichten hingegen in Kallussen Mutationsraten zwischen 25 und 33 % nach Transformation von *N. tabacum* Protoplasten mit drei TALEN-Paaren, deren Zielsequenzen sich in den *ACETOLACTAT-SYNTHASE* Genen (*SurA* und *SurB*) befanden. Die Regeneration von Pflanzen mit induzierten Mutationen wurde in diesem Zusammenhang jedoch nicht untersucht. Da in der vorliegenden Arbeit keine Analysen während des Kallusstadiums durchgeführt wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die TALENs überhaupt aktiv waren oder nicht. Das Fehlen publizierter Studien, in denen die gezielte Induktion von Mutationen durch TALENs in regenerierten *N. tabacum* Pflanzen untersucht wurde, könnte daran liegen, dass die Regeneration von Pflanzen mit TALEN-induzierten Mutationen prinzipiell schwierig ist. Eine mögliche Ursache hierfür könnte das für die TALENs verwendete Grundgerüst des AvrBs3 TALE Proteins (aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) sein. Marois *et al.* (2002) haben gezeigt, dass die transiente Expression des *AvrBs3* Gens in Blättern von Kartoffel und verschiedenen Tabakarten zu einer Hypertrophie der Mesophyllzellen führt, eine ähnliche Reaktion die die Infektion von anfälligen Paprika- und Tomatenpflanzen mit *X. campestris* pv. *vesicatoria* hervorruft. Im Gegensatz zu *N. tabacum* wurden in *N. benthamiana* nicht nur transiente Transgenexpression mit TALENs durchgeführt (Mahfouz *et al.* 2011), sondern auch Pflanzen aus transformierten Protoplasten regeneriert und analysiert (Li *et al.* 2016). Dabei wurde zum einen demonstriert, dass *N. benthamiana* mit Effizienzen von 50 bis 73 % mutiert werden kann und zum anderen, dass mit TALENs auch effizientes *Multiplex Genome Engineering* möglich ist (Li *et al.* 2016). Dass die stabile Integration beider TALEN-Einheiten nicht unbedingt notwendig ist, um Mutationen zu erzeugen, wurde in Gerste gezeigt (Gurushidze *et al.* 2014). Mittels DNA Gelblot Analyse wurde in der Mehrzahl der Gerstenpflanzen mit induzierten *gfp* Mutationen, nur die Kopie einer TALEN-Einheit nachgewiesen. Des Weiteren war die TALEN Vektorsequenz in sieben von 18 mutierten, primär transgenen Kartoffelpflanzen nicht detektierbar (Clasen *et al.* 2016). Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse aus Gerste und Kartoffel konnten in der vorliegenden Arbeit keine Mutationen in primär transgenen *N. tabacum* Pflanzen gefunden werden.

In dem Versuch Pflanzen mit beiden TALEN-Einheiten zu generieren, wurden Kreuzungsversuche mit primär transgenen Pflanzen durchgeführt, die eine der beiden *gfp*-spezifischen TALEN-Einheiten besaßen. Bei der Analyse von Kreuzungsnachkommen wurde lediglich eine Pflanze mit *gfp* Mutation identifiziert, was einer Effizienz von rund 3 % entspricht. Im Vergleich dazu konnten bei einem

entsprechenden Ansatz unter Verwendung des gleichen TALEN-Paares in Gerste Mutationen in 100 % der Nachkommen nachgewiesen werden, die beide TALEN-Einheiten vererbt bekommen hatten (Gurushidze *et al.* 2016). Ob generelle Unterschiede bei den Kreuzungsversuchen von Mono- und Dikotylen die Divergenz in den Mutationsraten herbeiführten bleibt offen.

4.1.1 Vererbbarkeit von TALEN-induzierten *gfp* Mutationen

Die Untersuchung der Vererbung von TALEN-induzierten Mutationen wurde anhand der Mutante #X-9 durchgeführt. Die Sanger-Sequenzierung zeigte, dass Mutationen in 10 % der untersuchten Nachkommen vorhanden waren, die maternale 36 bp Deletion aber nicht darunter war (Abb. 14). Aufgrund der geringen Effizienz des *gfp*-spezifischen TALEN-Paares ist davon auszugehen, dass die beiden Mutationen die genetisch fixiert vorlagen, bereits in der Mutterpflanze vorhanden waren und nicht beide Allele erst in den F₂ Individuen mutiert wurden. Alle vier neu detektierten Mutationen in der Nachkommenschaft befanden sich in der *Spacer* Region. Unter den wenigen Mutationen die im *gfp* induziert wurden, befanden sich hauptsächlich Deletionen die 1 bp bis 36 bp groß waren und eine Insertion von 1 bp in der *Spacer* Region (siehe Abb. 13 bis Abb. 15). In anderen Arbeiten zu *N. tabacum* und *N. benthamiana* wurden ausschließlich Deletionen gefunden (Zhang *et al.* 2013; Li *et al.* 2016), während in *Arabidopsis* (Christian *et al.* 2013), Gerste (Gurushidze *et al.* 2014) und Weizen (Wang *et al.* 2014) neben Deletionen auch Insertionen oder kombinierte Mutationen, die Deletionen und Insertionen beinhalten, detektiert wurden. Die Charakteristika von TALEN-induzierten Mutationen wurden in Reis detaillierter untersucht, wobei es sich bei etwa 70 % der Mutationen um Deletionen handelte, gefolgt von kombinierten Mutationen (~16 %), Substitutionen (~10 %) und nur wenigen Insertionen (~4 %; Zhang *et al.* 2016).

Auch bei der vegetativen Vermehrung der Mutante #X-9 wurden neue Mutationen in einem der Regenerate charakterisiert, die zuvor nicht in der Donorpflanze detektiert worden waren. Es handelte sich dabei um Deletionen von 1 bp bzw. 15 bp (Abb. 15), die sich aber von denen unterschieden, die in den mittels Selbstung generierten Nachkommen gefunden wurden (Abb. 14). Der Versuch die maternale 36 bp Deletion vegetativ zu erhalten, war jedoch nicht erfolgreich. Und wie schon bei den Kreuzungsversuchen und der Analyse der Nachkommen von Mutante #X-9, fiel die Mutationsrate mit 5,3 % auch bei der vegetativen Vermehrung unerwartet gering aus. Im Vergleich dazu wurde mit dem gleichen TALEN-Paar in Gerste eine Mutationsrate von etwa 20 % erreicht (Gurushidze *et al.* 2014). Neben den unterschiedlichen Promotoren die verwendet wurden, lassen sich auch Unterschiede in der Effizienz zwischen den Pflanzenarten nicht ausschließen. So sind z.B. in Reis (Li *et al.* 2012), Gerste (Gurushidze *et al.* 2014), Sojabohne (Haun *et al.* 2014) oder Kartoffel (Clasen *et al.* 2016) Mutationsraten von 3 bis 40 % beschrieben worden. Aber auch innerhalb einer Pflanzenart können Unterschiede bei der Erzeugung von Mutationen zwischen unterschiedlichen TALEN-Paaren auftreten, die ihre Zielsequenzen im selben Gen haben. So führte die Transformation

von Kartoffelprotoplasten mit drei TALEN-Paaren, die spezifisch für das *VAKUOLÄRE-INVERTASE* Gen sind, zu Mutationsraten von 3,6, 9,5 und 9,9 % (Clasen *et al.* 2016).

4.1.2 Die Verwendung von *NbCENH3*-spezifischen TALENs

Die Versuche *NbCENH3* mittels TALENs zu mutieren waren nicht erfolgreich, denn Mutationen konnten weder in den primär transgenen Pflanzen, in den Kreuzungsnachkommen noch in den vegetativ vermehrten Pflanzen, die beide TALEN-Einheiten besaßen, detektiert werden. In Anbetracht der geringen Effizienz der *gfp*-spezifischen TALENs ist insbesondere anzunehmen, dass der hierbei verwendete Promoter zu keiner ausreichenden Expression der TALEN-codierenden Sequenzen geführt hat. Während in der Studie von Li *et al.* (2016) die Promotersequenz des *NOPALIN-SYNTHASE* Gens für die Expression mutationsinduzierender TALENs verwendet wurde, handelte es sich in der vorliegenden Arbeit um den *UBIQUITIN-10* Promoter aus *A. thaliana* (*AtUbi10*). *UBIQUITIN* Promotoren sind in allen Organen aktiv, wobei eine besonders starke Expression in Pollen und Eizellen von unreifen Blüten gefunden wurde (Callis *et al.* 1990). Im Gegensatz dazu zeigt der *Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S* Promoter keine oder nur sehr geringe Aktivität in gametophytischen Zellen und während der beginnenden Embryogenese (Wilkinson *et al.* 1997; Custers *et al.* 1999). Da am Anfang dieses Projektes ebenfalls Transformationen unter Verwendung von unreifen Pollen geplant waren, wurde der *AtUbi10* Promoter ausgewählt, um eine solide Expression der TALENs auch während der Pollenembryogenese zu gewährleisten. Die biolistische Transformation von *N. benthamiana* Kallussen mit einer *gfp* Expressionskassette zum einen unter Kontrolle des *AtUbi10* Promoters (*AtUbi10P::gfp*) und zum anderen mit dem doppelt verstärkten *CaMV 35S* Promoter (*d35SP::gfp*) zeigte, dass die GFP Fluoreszenz bei Verwendung des letzteren Promoters stärker war als mit dem *AtUbi10* Promoter (siehe Anhang Abb. A 6). Auch 12 Tage nach dem Beschuss konnte immer noch GFP Fluoreszenz in vielen Zellen der Kallusse nachgewiesen werden, die mit der *d35SP::gfp* Expressionskassette beschossen worden waren, während bei den *AtUbi10P::gfp* Kallussen zum gleichen Zeitpunkt nur noch vereinzelte Zellen grün leuchteten (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass der verwendete *AtUbi10* Promoter zu schwach war, um eine für die Induktion von DSBs und Mutationen in der Zielregion ausreichende Expression der TALEN-codierenden Sequenzen herbeizuführen. In der Arbeit von Forner und Kollegen (2015) wurden TALENs unter die Kontrolle von verschiedenen Promotoren gestellt und die Mutationseffizienz in somatischem Gewebe von *A. thaliana* Pflanzen miteinander verglichen. Standen beide TALEN-Einheiten unter Kontrolle von ubiquitären Promotoren wurde eine Mutationsrate von 27,3 % erreicht, während bei der Kombination von einem ubiquitären Promoter und einem Meristem-spezifischen bzw. bei der Verwendung von ausschließlich Meristem-spezifischen Promotoren Effizienzen von 94,6 bzw. 91,8 % erreicht wurden (Forner *et al.* 2015).

Neben dem Promoter, der die Expression der TALENs steuert, haben ebenfalls die ausgewählten Binderegionen der beiden Einheiten einen Einfluss auf die Mutationseffizienz (Cermak *et al.* 2011). Die bei der transienten Co-Expression von *NbCENH3*-spezifischen TALENs mit einem Testvektor erzielte, unerwartet niedrige Effizienz der TALENs könnte ein Hinweis darauf sein, dass die *NbCENH3*-spezifischen DBDs nicht optimal waren. Darüber hinaus könnten sich Methylierungen an der nativen Zielsequenz negativ auf die Bindefähigkeit der TALENs an die Zielregion ausgewirkt haben (siehe Kapitel 4.4). Ob die Transformation der TALENs unter Verwendung eines anderen Explantats zu besseren Ergebnissen geführt hätte, bleibt ebenfalls offen. Ein Hinweis darauf, dass das Zielgewebe der Transformation einen Einfluss auf die Mutationsrate hat, wurde in Gerste gezeigt, wo Mutationen im *gfp* mit einer Effizienz von etwa 20 % erzeugt wurden, wenn embryogene Pollen für den Gentransfer der TALEN-codierenden Konstrukte dienten (Gurushidze *et al.* 2014), während der Gentransfer in unreife Embryonen mit dem gleichen TALEN-Paar zu einer Mutationsrate von lediglich rund 6 % (Budhagatapalli *et al.* 2016) führte.

4.2 Anwendung der gRNA-vermittelten Cas9 Endonuklease Plattform in zwei *Nicotiana* Arten

Das Einbringen eines *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 Konstrukts in eine *gfp* Einzelkopie-Linie von *N. tabacum* führte in der vorliegenden Studie bei 80 % der primär transgenen Pflanzen zu einer oder mehreren Mutationen in der Zielsequenz. In derselben Art wurden ähnliche Ergebnisse bei der gezielten Mutagenese des *PHYTOEN-DESATURASE* (*PDS*) Gens und des *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE* Gens erreicht (Gao *et al.* 2015). In *N. benthamiana* wurden in der vorliegenden Arbeit vier *NbCENH3*-spezifische gRNAs verwendet, von denen eine keine Mutationen induzierte (gRNA4) und die restlichen drei eine Effizienz von 25 bis 71,4 % erreichten. Im Vergleich dazu führte die Mutagenese des *PDS2* Gens in *N. benthamiana* Protoplasten zu Mutationsraten von 37,7 bzw. 38,5 % (Li *et al.* 2013). In einem anderen Versuch wurden Blätter von *N. benthamiana* mittels Agroinfiltration transformiert und Blattsegmente die *Cas9* und gRNA exprimierten, herausgeschnitten und kultiviert, um daraus Pflanzen mit Mutationen zu regenerieren; die Mutationsrate betrug dabei 6,6 % (Nekrasov *et al.* 2013). Wie bereits im vorherigen Kapitel für die TALENs diskutiert, könnte auch hier eine Erklärung für die unterschiedlichen Effizienzen bei den verwendeten Promotoren liegen. Während bei Nekrasov *et al.* (2013) der *CaMV 35S* Promoter benutzt wurde, waren die *gfp*- und *NbCENH3*-spezifischen RGENs der vorliegenden Studie unter der Kontrolle des *UBIQUITIN 4-2* Promoters aus *Petersilie*.

Die Auswahl der *NbCENH3*-spezifischen gRNAs erfolgte mit Hilfe des Internetportals CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>), wobei die am besten *in silico* bewerteten gRNAs mit möglichst wenigen *Off-Targets* herausgesucht wurden. *NbCENH3*-gRNA1 wurde insbesondere deshalb ausgewählt, weil diese in der Zielregion der *NbCENH3*-spezifischen TALENs bindet. Beim

dritten Exon des *NbCENH3* war die Auswahl möglicher gRNAs aufgrund der Kürze des Exons nur begrenzt. Die ausgewählten gRNAs wurden außerdem mit dem „*sgRNA design tool*“ des Broad Institutes (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>) miteinander verglichen. Dieses Vorhersagemodell für gRNA-Aktivitäten wurde auf Grundlage der Untersuchung mehrerer tausend gRNAs entwickelt und soll die Auswahl dieser für eine bestimmte Zielsequenz verbessern (Doench *et al.* 2014). Das Ergebnis der Analyse ist eine Rangfolge von gRNAs, die mit Hilfe des „*sgRNA design tool*“ anhand zahlreicher Kriterien wie z.B. Effizienz von Nukleotidbesetzungen in den einzelnen Positionen oder GC-Gehalt errechnet wurde. In der sich ergebenden Rangfolge belegten *NbCENH3*-gRNA1 Rang 17 und gRNA2 Rang 18, während gRNA3 und 4 nicht unter den ersten 20 Rängen aufgeführt waren. Daraus folgend wäre die *NbCENH3*-gRNA1 am effizientesten, während gRNA3 und 4 weniger häufig Mutationen erzeugen. Diese Beurteilung wurde im Wesentlichen durch die Ergebnisse der Analyse primär transgener Pflanzen bestätigt (Tab. 18). Anzumerken ist hierbei, dass es sich im Besonderen bei gRNA2 jedoch um nur wenige primär transgene Pflanzen handelte die regeneriert wurden, was die Aussagekraft einschränkt. Die Ergebnisse von den stabil transgenen Pflanzen stehen andererseits zum Teil im Gegensatz zu denen aus der transienten Co-Expression der gRNA/Cas9 Konstrukte mit einem Testvektor, da hier die *NbCENH3*-spezifische gRNA2 und 4 eine sehr geringe Effizienz zeigten, während gRNA1 und 3 bessere und nahezu identische Mutationsraten hatten (Tab. 16). Auf die Vor- und Nachteile der hier verwendeten transienten Transgenexpression wird in Kapitel 4.3 eingegangen.

Tab. 18: Vergleich von Mutationsraten, GC-Gehalt und sequenziellen Besonderheiten der verwendeten *gfp*- und *NbCENH3*-spezifischen gRNAs.

Pflanzenart	Zielgen	gRNA	Anz. T ₀ Pflanzen	Anz. T ₀ Pflanzen mit Mutation(en)	Mutations- rate	GC-Gehalt der gRNA	Nukleotide am 3'-Ende des <i>Protospacers</i>
<i>N. benthamiana</i>	<i>CENH3</i>	gRNA1	7	5	71,4 %	55 %	GCGT
		gRNA2	2	1	50,0 %	70 %	TTGG
		gRNA3	12	3	25,0 %	50 %	TTGT
		gRNA4	9	0	0 %	60 %	CCTC
<i>N. tabacum</i>	<i>gfp</i>	gRNA1	15	12	80,0 %	55 %	TTCA

In der Arbeit von Wang *et al.* (2014) wurde gezeigt, dass gRNAs mit einem sehr hohen oder niedrigen GC-Gehalt weniger effizient bei der Induktion von Mutationen in der Zielregion sind. Dieses Ergebnis wurde in Tomate bestätigt, wo drei gRNAs mit einem GC-Gehalt von 50 bis 60 % zu hohen Mutationsraten (84-100 %) führten, während eine gRNA mit 40 % GC-Gehalt eine geringere Effizienz von 72 % hatte (Pan *et al.* 2016). Die in Tab. 18 aufgeführten GC-Gehalte der *gfp*- sowie *NbCENH3*-spezifischen gRNAs zeigen, dass alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten gRNAs einen GC-Gehalt von mindestens 50 % hatten. Dennoch sind die Unterschiede zwischen den erlangten Mutationsraten groß und es besteht keine Korrelation zwischen GC-Gehalt und Effizienz, was möglicherweise auf den Einfluss zahlreicher anderer Effizienz-Kriterien zurückzuführen ist. Beispielsweise hat die Nukleotid-

Zusammensetzung am 3'-Ende des *Protospacers* einen Einfluss auf die Effizienz der gRNAs, da die Cas9 bevorzugt an gRNAs bindet, bei denen die letzten vier Nukleotide des *Protospacers* Purine enthalten, während Pyrimidine missbilligt werden (Wang *et al.* 2014). Die letzten vier Nukleotide der *NbCENH3*-spezifischen gRNA4 waren nur Pyrimidine, was eine mögliche Erklärung für dessen ausbleibende Funktionalität sein könnte (Tab. 18). Außerdem wurde gezeigt, dass das Expressionsniveau der gRNA einen größeren Einfluss bei der Induktion von Mutationen hat als das der Cas9. Geringe bis sehr geringe Expression der gRNA wurde sowohl in transgenen *Arabidopsis*- als auch Tomatenpflanzen gefunden, in denen keine Mutationen induziert wurden, während Mutanten durch vergleichsweise hohe Expression der gRNA gekennzeichnet waren (Ma *et al.* 2015; Pan *et al.* 2016); die Expression der Cas9 war dabei in WT Pflanzen und Mutanten gleich stark.

Die beachtliche Häufigkeit mit der nur eine Teilintegration der gRNA/Cas9 T-DNAs erfolgte (Vergl. Tab. 13 und Tab. 17), lässt sich durch die Instabilität der linken T-DNA Randsequenz erklären, da gezeigt wurde, dass der rechte T-DNA Rand präziser eingebaut wird als der linke (Tinland 1996; Kim *et al.* 2003). Die Klonierung des Selektionsmarkers in die Nähe des linken Randes, sollte in einem größeren Anteil Transgener resultieren, die die vollständige T-DNA beinhalten, während der hier verwendete Vektor den Selektionsmarker nahe der rechten Grenze hatte (siehe Abb. 22). In den wenigen dokumentierten Fällen, in denen die Integrität der gRNA/Cas9 T-DNA untersucht wurde, konnten ebenfalls Teilintegrationen festgestellt werden, die erwartungsgemäß keine Mutationen in den entsprechenden Pflanzen induziert hatten (Zhou *et al.* 2014; Xu *et al.* 2015).

4.2.1 Vererbbarkeit von gRNA/Cas9-induzierten *gfp* Mutationen

Die sexuelle Vererbbarkeit von gRNA/Cas9-induzierten Mutationen wurde bisher noch nicht in einer *Nicotiana* Art gezeigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Vererbung von *gfp* Mutationen in die T₁ Generation spiegeln die Resultate von Reis (Zhou *et al.* 2014; Xu *et al.* 2015) und *A. thaliana* (Feng *et al.* 2014; Jiang *et al.* 2014) wieder, in denen gezeigt wurde, dass nicht alle Mutationen aus den primär transgenen Pflanzen in der nächsten Generation wieder detektiert wurden. Zum Beispiel konnte die 1 bp Insertion nicht aber die 7 bp Deletion, welche in der T₀ Pflanze #125 vorhanden waren, unter den 50 untersuchten T₁ Pflanzen wiedergefunden werden (Abb. 28). Jedoch war es möglich die 7 bp Deletion sowohl durch embryogene Pollenkultur als auch über *in vitro* vegetative Vermehrung zu erhalten (Abb. 32, Abb. 35). Folglich sind diese beiden alternativen Möglichkeiten der Erzeugung von Nachkommen nützlich, um Mutationen, die zu selten oder überhaupt nicht sexuell vererbt werden, zu erhalten. Neben anderen Solanaceae Arten wie Tomate (McCormick *et al.* 1986), Kartoffel (Chong *et al.* 1997) oder Aubergine (Rotino & Gleddie 1990) besitzen auch Apfel (James *et al.* 1989) und *Arabidopsis*-Pflanzen (Schmidt & Willmitzer 1988) die Veranlagung für eine vegetative Vermehrung und somit die Möglichkeit gRNA/Cas9-induzierte Mutationen vegetativ zu erhalten. Auch die Haploidentechnologien sind nicht auf Tabak beschränkt,

da Doppelhaploide in Hunderten von Pflanzenarten generiert werden können (Kumlehn 2009). Transformationen, bei denen Mikrosporen als Explantate verwendet werden, wurden unter anderem in *N. tabacum* (Sangwan *et al.* 1993), Raps (Fukuoka *et al.* 1998) und Gerste (Kumlehn *et al.* 2006) etabliert.

Unabhängig von der Art der Vermehrung, konnten Mutationen die nicht in der T_0 Generation detektiert wurden unter den Nachkommen gefunden werden. Es ist dabei unklar, welche dieser Mutationen bereits in der T_0 Pflanze vorhanden waren, aber nicht detektiert wurden und welche in den Nachkommen, die die gRNA/Cas9 Expressionskassette und das *gfp* WT Allel enthielten, neu induziert wurden. Als Beispiel ist T_0 Pflanze #126 zu nennen, in der keine Mutationen detektiert werden konnten und dennoch unter den T_1 Nachkommen Mutanten identifiziert wurden, einige von ihnen sogar im homozygoten Status (Abb. 29). Die Homozygotie von nahezu der Hälfte dieser neuen Mutanten in der T_1 Generation suggeriert, dass die Mutationen bereits in der T_0 Pflanze induziert wurden, aber unentdeckt blieben. Zhang *et al.* (2014) konnten beim Vergleich von DNA, die von verschiedenen Teilen einer T_0 Pflanze hergestellt wurde, unterschiedliche Mutationen detektieren. Daraus ergeben sich drei mögliche Szenarien für die hier untersuchten Pflanzen: (1) die Mutationen traten in Gewebe der T_0 Pflanze auf, das bei der Blattprobenentnahme nicht erfasst wurde, oder (2) wurden nach der Probennahme induziert und/oder (3) die veränderte(n) *gfp* Sequenz(en) repräsentierten zu kleine Anteile der untersuchten DNA, sodass die Sensitivität des T7E1 Assays nicht ausreichte, um diese zu detektieren. Dass der T7E1 Assay Grenzen in der Sensitivität von Mutationen aufweist, bestätigt sich durch insgesamt 53 falsch-negative Ergebnisse, die während der Untersuchung der Nachkommen, durch die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte aufgedeckt wurden. Eine Alternative zum T7E1 Assay ist z.B. ein auf Restriktionsenzymen basierender Assay (Lloyd *et al.* 2005), bei dem eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym nahe der PAM verwendet wird, um induzierte Mutationen zu detektieren. Durch die Mutationen wird die Erkennungssequenz zerstört, was durch unverdaute Banden sichtbar wird. Allerdings ist es nicht immer möglich passende gRNAs mit einer Restriktionsschnittstelle nahe der PAM zu finden. Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Mutanten sowie WT Pflanzen stellt das *High Resolution Melting* (Wittwer *et al.* 2003) dar, mit dem auf Grundlage von Heteroduplex-Regionen in den Amplifikaten zwischen mutierten und WT Sequenzen differenziert werden kann. Diese Methode hat jedoch auch eine nur relativ geringe Sensitivität. Im Gegensatz dazu können mittels *Amplicon Deep Sequencing* auch seltene Mutationen detektiert werden. Diese Methode ist hingegen besonders arbeitsaufwändig und kostenintensiv. Darüber hinaus ist es zumeist nicht erforderlich die in chimären Pflanzen besonders wenig repräsentierten Mutationen zu detektieren, da sie nur mit außerordentlich geringer Wahrscheinlichkeit vererbt werden.

Eine relativ hohe Anzahl – wenn nicht sogar alle - der T_0 Pflanzen war chimär hinsichtlich der Mutationen in der Zielregion. Dieses Phänomen wird nicht nur dadurch ermöglicht, dass ein regenerierender Spross aus mehr als einer Zelle entstehen kann, sondern auch weil die gRNA/Cas9 prinzipiell eine große Anzahl unabhängiger Mutationsereignisse in verschiedenen Zellen eines sich entwickelnden Individuums erzeugen kann, solange eine intakte Zielregion vorhanden ist. Die Auflösung von Chimären benötigt normalerweise das Durchlaufen der Meiose, was zum einen durch konventionelle Gametenfusion oder in effizienterer Weise durch das Ausnutzen der Totipotenz von unreifen Pollen erreicht werden kann. Während eine etwa 60 %ige Fixierung durch die Regeneration von Pflanzen aus der embryogenen Pollenkultur erreicht wurde, betrug die Rate unter den konventionell generierten T_1 Generationen nur ein Drittel dessen (Tab. 15). Dabei ist zu erwähnen, dass keine homozygoten Mutanten von Pflanze #254 durch die konventionelle Route erhalten wurden. Eine ähnliche Problematik wurde bei der Fixierung von induzierten Mutationen in *A. thaliana* festgestellt (Feng *et al.* 2014; Hyun *et al.* 2015).

An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass die Regeneration von Pflanzen aus der embryogenen Pollenkultur unter Verwendung des Selektionsagens Bialaphos erfolgte, da es ein ursprüngliches Ziel der Untersuchung war, eine maximal mögliche Effizienz der Produktion von homozygoten Mutanten zu demonstrieren. Ein eindeutiger Vergleich der Anteile homozygoter Mutanten aus der embryogenen Pollenkultur mit den T_1 Individuen der selbstbestäubten T_0 Pflanzen kann gezogen werden, wenn auch für die Selbstung nur die Individuen betrachtet werden, die die gRNA/Cas9 T-DNA enthielten. Im Vergleich zu den Daten aus Tab. 15 ist das Ergebnis dieser Simulation selektiver Bedingungen für die sexuell produzierten Nachkommen folgendes: nur 31,8 % von diesen T-DNA positiven T_1 Pflanzen beherbergten eine mutierte Zielsequenz im homozygoten Zustand, während der Anteil unter den Doppelhaploiden etwa 60 % betrug. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass im Durchschnitt bei den T_1 Individuen zwei Mutationen genetisch fixiert wurden, verglichen mit sieben fixierten Mutationen als Ergebnis der embryogenen Pollenkultur. Dies zeigt, dass die Vielfalt der Mutationen unter den Doppelhaploiden wesentlich größer ist. Angesichts der Tatsache, dass die integrierte T-DNA und die induzierten Mutationen üblicherweise ungekoppelt sind, gibt es keinen Zweifel daran, dass die Generierung von homozygoten Mutanten aus einer embryogenen Pollenkultur auch ohne Selektionsdruck möglich ist. Andererseits ist die Entfernung der gRNA/Cas9 T-DNA nicht für alle Anwendungen notwendig, da verbliebene T-DNAs z.B. bei Studien zur Erforschung von Genfunktionen tolerierbar sind, solange die veränderte Zielsequenz nicht mehr von der gRNA/Cas9 erkannt und weiter modifiziert werden kann und keine *Off-Target* Effekte vorhanden sind. Zusammenfassend ist zu sagen dass, entsprechend der Präferenzen, individuell darüber entschieden werden kann, ob Selektionsdruck angewendet werden soll oder nicht.

Die Analyse von T₂ Pflanzen ausgewählter selbstbestäubter T₁ *gfp* Mutanten zeigte, dass auch in der T₂ Generation neue Mutationen auftraten, aber die Anzahl im Vergleich zur T₁ Generation geringer war (siehe Anhang Tab. A 1), was mit den Ergebnissen aus der Nachkommenschaftsanalyse von *Arabidopsis*-Pflanzen übereinstimmt (Feng *et al.* 2014). Des Weiteren wurden im Durchschnitt 87,5 % der *gfp* Mutationen, die bereits in der T₁ Mutterpflanze vorhanden waren, in die nächste Generation übertragen. Der Anteil von Pflanzen, die das *gfp* WT Allel genetisch fixiert hatten, war in der T₂ Generation (1,7 %) deutlich geringer als in der T₁ Generation (16,4 %), während sich der Anteil homozygoter *gfp* Mutanten verdoppelte. Pflanzen die neben der *gfp* WT Sequenz eine oder mehrere veränderte *gfp* Sequenzen enthielten, kamen in gleichem Maße in der T₁ und T₂ Generation vor (Anhang Tab. A 1). Auch die Nachkommenschaftsanalyse in *Arabidopsis* zeigte eine Steigerung des Prozentsatzes bei homozygoten Mutanten, während WT Pflanzen seltener vorkamen, aber der Anteil heterozygot/chimärer Pflanzen gleich blieb (Feng *et al.* 2014). Bei der Analyse von T₂ Individuen einer mutmaßlich homozygoten T₁ *gfp* Mutante wurde unter den Nachkommen ausschließlich die eine in der Mutterpflanze vorhandene Mutation identifiziert (siehe Kapitel 3.3.6). Wie z.B. auch in Reis gezeigt (Xu *et al.* 2015), wurde die maternale Mutation trotz der noch vorhandenen gRNA/Cas9 T-DNA nicht weiter modifiziert.

Die Fixierung von Mutationen unabhängig vom Durchlaufen der Meiose kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für dieses zunächst unerwartete Ergebnis ist, dass in einer heterozygot mutierten Zelle ein DSB in dem immer noch vorhandenen *gfp* WT Allel durch die RNA-vermittelte Cas9 erzeugt und dann über homologe Rekombination repariert wurde, wobei die zuvor veränderte Sequenz als Reparaturvorlage dient. Die These wird durch den Befund der vorliegenden Arbeit gestützt, dass selbst ein Regenerat aus der vegetativen Erhaltung (#125-SC02, siehe Abb. 36) eine Mutation im homozygoten Status aufwies.

4.2.2 Charakteristika gRNA/Cas9-induzierter Mutationen und der Einfluss von Mutationen ohne Leserahmenverschiebung auf die GFP Fluoreszenz

Vielfalt, Muster und Häufigkeit von gRNA/Cas9-induzierten Mutationen im *gfp*, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, entsprechen den Erfahrungen aus publizierten Studien zur Anwendung von gRNA-vermittelter Cas9 Endonuklease in Reis und Tomate, bei denen häufig kleine Deletionen und fast ausschließlich 1 bp Insertionen auftraten (Zhang *et al.* 2014; Pan *et al.* 2016). Im Gegensatz dazu variierte die Länge der Insertionen in *A. thaliana* mehr (Feng *et al.* 2014). Bei der Analyse der 1 bp Insertionen der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass es sich im Falle der *gfp* Mutationen ausschließlich um Thymin Insertionen handelte, während bei den induzierten Mutationen im *NbCENH3* am häufigsten Thymin, aber auch Guanin oder Adenin integriert wurden (Vergl. Abb. 42 und Abb. 43). In Tomate wurden hingegen nur Adenin und Thymin Insertionen identifiziert (Pan *et al.* 2016), während in Reis neben Adenin und Thymin auch in wenigen Fällen Guanin oder Cytosin

Insertionen auftraten (Zhang *et al.* 2014; Ma *et al.* 2015). Die Grundlage für diese Abweichungen dürfte in den artspezifischen Unterschieden bei der Aktivität und den Präferenzen der komplexen endogenen DNA Reparaturmechanismen liegen.

Rund 29 % der induzierten *gfp* Mutationen führte nicht zu einer Verschiebung des translationalen Leserahmens. Die Analyse der GFP Fluoreszenz von ausgewählten *In-Frame* Mutanten ergab, dass die Deletion von 18 bis 96 Aminosäuren zu einem Verlust des GFP Signals führte, während die Deletion von Aminosäure D129 sowie die Mutation Δ D129/F130V eine starke Reduzierung der Fluoreszenz verursachte (Abb. 39). Aminosäure D129 ist Teil des längsten *Loops* des GFP Proteins (I128-L141, siehe Abb. 4) und die meisten bislang bekannten Deletionen in dieser Region zerstören die GFP Fluoreszenz aufgrund inkorrekt Faltung des Proteins (Flores-Ramírez *et al.* 2007). In derselben wissenschaftlichen Veröffentlichung wurde gezeigt, dass die Mutation Δ D129 das GFP Signal konserviert hatte, wenn auch in geringerer Ausprägung als der GFP WT, was durch einen reduzierten Proteingehalt verursacht wurde. Diese anhand von *E. coli gfp* Mutanten erzielten Ergebnisse könnten ebenfalls auf die entsprechenden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzen zutreffen. Eine Untersuchung dieser Annahme mittels Western Blot würde Aufschluss über den Proteingehalt in den mutierten Pflanzen geben. Des Weiteren wäre zu unterscheiden, ob die Verringerung von Proteinsynthese oder –stabilität eigentliche Ursache der reduzierten Proteinabundanz ist. In der Mutante mit der 2 bp Substitution, die den F130G Austausch herbeiführte, konnte kein GFP Signal detektiert werden. Ebenfalls in der Studie von Flores-Ramírez und Kollegen (2007) wurde gezeigt, dass ein Austausch von Phenylalanin an Position 130 nur durch Aminosäuren mit hydrophobem Rest toleriert wird. Da in der Pflanze #125-P58-01 F130 durch ein Glycin ersetzt wurde, könnte das den Verlust der GFP Fluoreszenz erklären, da F130 wichtig für die Fixierung des längsten *Loops* ist und durch den Austausch die Proteinstabilität nicht mehr gegeben wäre.

Die mittels *Genome Engineering* erzielte Verringerung der Proteinabundanz bzw. –aktivität ermöglicht die Erforschung der Funktionen insbesondere von für Pflanzen essentiellen Genen. Durch die bessere Stabilität des Effektes dürfte das *Genome Engineering* der bislang dafür genutzten RNA Interferenz überlegen sein. Des Weiteren ergeben sich aus der Möglichkeit solcher quantitativer Veränderungen zusätzliche biotechnologische Optionen.

4.2.3 gRNA/Cas9-induzierte *Nbcenh3* Mutanten als Haploidie-Inducer-Linien – ein Ausblick

Für die Anwendung als Haploidie-Inducer-Linie müssen Pflanzen mit einer homozygoten *Nbcenh3* Mutation generiert werden. Sowohl in *Arabidopsis* als auch in Mais wurde demonstriert, dass der Knock-out von *CENH3* zygotisch letal ist (Ravi & Chan 2010; Ravi *et al.* 2010; Kelliher *et al.* 2016). In *Arabidopsis* wurden verschiedene sogenannte *CENH3-tailswap* Konstrukte zur Komplementierung von *cenh3-1* Nullmutanten verwendet, bei denen der N-Terminus des nativen *CENH3* ausgetauscht

wurde. Ravi *et al.* (2011) zeigten, dass sowohl das *GFP-tailswap* Konstrukt mit dem N-Terminus des kanonischen Histons H3.3 aus *A. thaliana* als auch das *GFP-maizetailswap* Konstrukt (N-terminale Region des CENH3 aus Mais) den letalen Phänotyp der *Arabidopsis cenh3-1* Mutanten komplementieren konnten. Aus diesem Grund sollten heterozygote *Nbcenh3* Mutanten mit Pflanzen gekreuzt werden, die eines der beiden in der vorliegenden Arbeit generierten CENH3-Derivate enthalten, um die Funktionalität des CENH3 partiell zu komplementieren.

GFP-tailswap und *GFP-maizetailswap* Pflanzen wiesen phänotypische Veränderungen im Vergleich zu *Arabidopsis CENH3* WT Pflanzen auf, die sich durch deformierte Blätter und kürzere Internodien äußerten. Des Weiteren waren diese Pflanzen steril, wobei *GFP-maizetailswap* Pflanzen davon stärker betroffen waren (Ravi & Chan 2010; Ravi *et al.* 2010; Ravi *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt neun Pflanzen mit *Nbcenh3* Mutationen generiert werden, von denen sich fünf phänotypisch von *NbCENH3* WT Pflanzen unterschieden (Abb. 44). Da es sich hierbei um vier unabhängige primär transgene Pflanzen handelte (zwei waren Geschwisterpflanzen), ist es unwahrscheinlich, dass sich der Phänotyp als Folge der Integration der T-DNA an einer bestimmten Stelle im Genom entwickelte. Anhand der T₁ Generation wird es möglich sein diese Annahme experimentell zu bestätigen. Sind T₁ Pflanzen mit *Nbcenh3* Mutation transgenfrei und besitzen diese den gleichen Phänotyp wie die primär transgene Pflanze, ist dies höchstwahrscheinlich auf die Mutation zurückzuführen. Eine endgültige Bestätigung würde die Untersuchung von möglichen *Off-Target* Mutationen in den jeweiligen Pflanzen erbringen.

Es besteht die Möglichkeit, dass homozygote Mutanten, die kleine Mutationen ohne Leserahmenverschiebung, wie z.B. die 6 bp und 12 bp Deletionen oder die 1 bp Substitution (Abb. 42c, Abb. 43), auch ohne Komplementationskonstrukt überlebensfähig sind. Es wurde demonstriert, dass durch die Transformation von *Arabidopsis cenh3-1* Nullmutanten mit verschiedenen CENH3-Derivaten, die bis auf eine Punktmutation dem nativen Gen entsprachen, der *cenh3-1* Phänotyp gerettet werden konnte (Karimi-Ashtiyani *et al.* 2015; Kuppu *et al.* 2015). Des Weiteren deuten die Ergebnisse aus der Untersuchung der GFP Fluoreszenz von *gfp* Mutanten ohne Leserahmenverschiebung darauf hin, dass bestimmte Veränderungen in der Zielsequenz die Funktionalität des Proteins in abgeschwächter Form erhalten (Abb. 39). Deshalb wäre es sinnvoll die Nachkommen von primär transgenen Pflanzen mit *Nbcenh3* Mutationen zu untersuchen, um eventuell homozygote Mutanten ohne Leserahmenverschiebung zu charakterisieren.

Das Potential zur Induzierung von Genomeliminierung und der daraus folgenden Herstellung von haploiden Pflanzen muss anschließend mit den charakterisierten, homozygoten *Nbcenh3* Mutanten untersucht werden. Dabei sollen auch die Effizienzen in der Erzeugung von Haploiden bei den beiden hier verwendeten Komplementationskonstrukten miteinander verglichen werden. In der Arbeit von Kuppu und Kollegen (2015) variierte der Anteil von Haploiden nach Kreuzungen mit *CENH3* WT

Pflanzen von 0,6 bis 12,2 % zwischen den unterschiedlichen CENH3-Derivaten. In der Studie von Karimi-Ashtiyani und Kollegen (2015) wurde gezeigt, dass als Folge einer Punktmutation ein Aminosäureaustausch von Alanin an Position 130 zu Phenylalanin (L130F) zu einer verminderten Beladung des *CENH3* bei *A. thaliana*, *Hordeum vulgare* und *Beta vulgaris* führt. Durch die Kreuzung von *Atcenh3* L130F mit *AtCENH3* WT Pollen wurden haploide Nachkommen mit einer Rate von 4,8 % erzeugt (Karimi-Ashtiyani *et al.* 2015).

4.3 Transiente Transgenexpression zur Validierung von Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen

Neben der Auswahl von geeigneten Zielsequenzen mit Hilfe von *Online* verfügbaren Plattformen, ist die Validierung dieser sowie der entsprechend spezifizierten Endonukleasen mittels transienter Expression praktikabel, um sich die spätere Arbeit bei der Erzeugung von stabil transgenen Pflanzen zu erleichtern. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete transiente Expression von Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen und einem Testvektor (Budhagatapalli *et al.* 2016) wurde in ähnlicher Form kürzlich beschrieben. Hierbei wurde die transiente Expression durch Infiltration von Blättern mit Agrobakterien erreicht (Jiang *et al.* 2013), was die Anwendung dieses Assays auf wenige Pflanzenarten beschränkt. Die biolistische Transformation ermöglicht hingegen die Verwendung eines breiten Spektrums an Pflanzenarten, das Mono- und Dikotyle einschließt. Des Weiteren konnten, in der vorliegenden Arbeit, durch konstitutive Co-Expression einer *mCherry* Expressionskassette die auf der Endonukleaseaktivität beruhenden Werte normalisiert und somit eine vergleichende Quantifizierung der induzierten Mutationsraten vorgenommen werden.

Die transiente Co-Expression des Testvektors mit den *gfp*- oder *NbCENH3*-spezifischen TALENs führte zu Mutationsraten von 27,5 bzw. 3 %. Die Tendenz, mit der die *gfp*-spezifischen TALENs im Testassay effizienter waren als die *NbCENH3*-spezifischen, bestätigte sich bei der Analyse stabil transgener Pflanzen, wobei die Effizienz der *gfp* TALENs hier mit 2,9 % geringer ausfiel. Aufgrund der hohen Gendosis bei der transienten Expression mittels Partikelbeschuss, wird hier von vorn herein mit einer deutlich höheren Effizienz gerechnet. Im Vergleich dazu wird beim Agrobakterien-vermittelten Gentransfer zur Herstellung stabil transgener Pflanzen eine geringere Anzahl an Expressionskassetten integriert. Des Weiteren bietet die für den Expressionsassay verwendete pDNA optimale Bedingungen für die TALENs, da sie nicht wie die native Zielregion epigenetischen Modifikationen (siehe Kapitel 4.4) unterliegt.

Hinsichtlich der *gfp*- und *NbCENH3*-spezifischen gRNA/Cas9 wurden unterschiedliche Mutationsraten mittels transienter Co-Expression mit dem jeweiligen Testvektor erreicht (siehe Tab. 9 und Tab. 16). Mit 74,6 % war die *gfp*-spezifische gRNA/Cas9 am effizientesten, während *NbCNEH3*-gRNA2 und 4 nur sehr geringe Erfolgsraten erzielten. Die sehr hohe Effizienz der *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 lässt sich zum Teil dadurch erklären, dass gRNA/Cas9-induzierte Mutationen sehr häufig

1 bp Insertionen sind (Feng *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014). Daraus folgt, dass die drei möglichen translationalen Leserahmen des *yfp* in diesem Fall nicht in ausgeglichenen Anteilen vorlagen und die bevorzugte 1 bp Insertion zur Wiederherstellung des funktionalen *yfp* führte. Bei der Analyse von regenerierten, stabil transgenen Pflanzen wurde die gute Effizienz der *gfp*-spezifischen gRNA/Cas9 verifiziert, während sich die Unterschiede der *NbCENH3*-gRNAs aus der transienten Transgenexpression nicht bestätigten (siehe Tab. 18). Gründe für die Diskrepanz zwischen transienter Expression und stabil transgenen Pflanzen können, neben den bereits im vorherigen Abschnitt genannten, die Spezifität und Stärke des Promoters, der Zelltyp und das Entwicklungsstadium sein. Des Weiteren können die vorherrschenden Bedingungen bei den verschiedenen Gentransfermethoden und die verwendeten Zielgewebe Einfluss auf die Effizienz der Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen nehmen (Budhagatapalli *et al.* 2016).

4.4 Die TALEN und gRNA/Cas9 Plattformen im Vergleich

Der Vergleich der TALEN und gRNA/Cas9 Plattformen beginnt mit dem Design der Zielsequenzen sowie den anschließenden Klonierungsarbeiten. Die Assemblierung von TALENs ist vergleichsweise kompliziert, da die repetitiven Einheiten sich nicht mit einfachen Methoden klonieren lassen, sondern z.B. auf Golden Gate Klonierung zurückgegriffen werden muss (Cermak *et al.* 2011). Die Assemblierung der TALENs wird auch von Firmen als Service angeboten, was für die hier verwendeten *gfp*- und *NbCENH3*-spezifischen TALENs genutzt wurde, jedoch sehr kostenintensiv ist. Im Vergleich dazu ist die Klonierung einer gRNA für die gRNA-vermittelte Cas9 Endonuklease einfach und außerordentlich kostengünstig. Für die Auswahl von TALEN Zielsequenzen ist das wichtigste Kriterium, dass am 5'-Ende der DBD ein Thymin vorhanden ist, welches für die Bindung der TALENs an die DNA benötigt wird (Mak *et al.* 2012), aber auch die Anzahl möglicher Zielsequenzen limitiert. Des Weiteren wird durch diese Notwendigkeit die Variabilität der Anzahl der Wiederholungen der DBD sowie die der *Spacer* Länge eingeschränkt. Ein Kriterium für die Auswahl geeigneter gRNAs ist das PAM, eine Sequenz am 3'-Ende des *Protospacers* bestehend aus NGG (im Falle der Cas9 aus dem *S. pyogenes* Typ II System), welche von der Cas9 erkannt wird und wichtig für die Ziel-DNA Bindung ist (Jinek *et al.* 2012). Bei der Untersuchung von genomischer DNA von acht Pflanzenarten wurden fünf bis 12 NGG PAMs pro 100 bp identifiziert; wobei die Anzahl der PAMs positiv mit der Genomgröße korrelierte (Xie *et al.* 2014). Alternativen zur Cas9 aus *S. pyogenes* bieten z.B. die Cas9 aus *Staphylococcus aureus* (Ran *et al.* 2015) oder die Cpf1 aus *Francisella novicida* (Zetsche *et al.* 2015), welche alternative PAM Sequenzen erkennen und dadurch die Auswahlmöglichkeiten von Zielsequenzen erhöhen. In Pflanzen werden gRNAs durch RNA Polymerase III Promotoren exprimiert, die definierte Nukleotide für den Transkriptionsstart haben. Abhängig davon ob ein U3 oder U6 Promoter verwendet wird, handelt es sich dabei um ein Adenin oder Guanin, welches beim designen der gRNAs beachtet werden muss (Belhaj *et al.* 2013). Vor kurzem wurde allerdings in Reis gezeigt,

dass die Mutationsraten zwischen regulären Zielen (solchen, die ein Adenin oder Guanin als Start-Nukleotid hatten) und irregulären (solchen, mit einem Thymin oder Cytosin) sich mit 84,3 und 86,9 % nur unerheblich unterschieden (Ma *et al.* 2015). In anderen Studien wurde demonstriert, dass RNA Polymerase II Promotoren ebenfalls zur Expression von gRNAs verwendet werden können (Upadhyay *et al.* 2013; Jia & Wang 2014). Diese Möglichkeiten erweitern die Anzahl von geeigneten gRNAs innerhalb einer Zielregion. Während der GC-Gehalt einen Einfluss auf die Effizienz der gRNA/Cas9 hat (Wang *et al.* 2014), wirken sich epigenetische Modifikationen, wie z.B. Cytosin Methylierungen, an den Zielsequenzen negativ auf die Bindefähigkeit und daraus folgend auch auf die Effizienz der TALENs aus (Valton *et al.* 2012). In humanen Zellen wurde gezeigt, dass Cytosin Methylierungen hingegen keinen Einfluss auf die Effizienz von gRNA/Cas9 nehmen (Hsu *et al.* 2013). Neben diesen Kriterien spielt auch die Anzahl möglicher *Off-Targets* bei der Auswahl der Zielsequenzen eine Rolle. Die Tatsache dass TALENs als Paar designt werden müssen, erhöht deren Spezifität. Außerdem kann die Anzahl der Wiederholungen und somit auch die Länge der DBD variabel gestaltet werden, was nicht nur Einfluss auf die Spezifität sondern auch auf die Effizienz der TALENs nimmt. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität der TALENs am stärksten ist, wenn die DBD aus 10,5 oder mehr Wiederholungen besteht (Boch *et al.* 2009). Im Vergleich dazu ist die Erkennungssequenz der gRNA/Cas9 lediglich 23 bp lang (*Protospacer* und PAM zusammen) und hinzu kommt, dass am 5'-Ende des *Protospacers* Fehlpaarungen toleriert werden (Fu *et al.* 2013; Hsu *et al.* 2013). Durch Punktmutationen in einer der beiden Nukleasedomänen der Cas9, kann diese auch als Nickase fungieren und wie *FokI* Monomere Einzelstrangbrüche erzeugen (Jinek *et al.* 2012); die paarweise Verwendung von zwei gRNA/Cas9 Nickasen erhöht somit die Spezifität. In *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass mit zwei gRNA/Cas9 Nickasen ein ähnliches mutagenes Potential erreicht werden kann, wie mit einer Cas9 Nuklease (Schiml *et al.* 2014). Des Weiteren konnte mit zwei gRNA/Cas9 Nickasen homologe Rekombination induziert werden, wobei die Nickasen effizienter waren als die Cas9 Nuklease (Fauser *et al.* 2014).

Die Verwendung von *gfp*-spezifischen TALENs bzw. gRNA/Cas9 führte in der vorliegenden Arbeit zu unterschiedlichen Effizienzen bei der Erzeugung von Mutationen, wobei die gRNA/Cas9 (80 %) wesentlich effizienter war als die TALENs (3 %). Beim *Genome Engineering* von *NbCENH3* konnten Mutationen ausschließlich mit der gRNA-vermittelten Cas9 induziert werden. Die hier verwendeten gRNA/Cas9 Vektoren beinhalteten sowohl *Cas9* als auch die gRNA, während die beiden TALEN-Einheiten co-transformiert werden mussten, da sie als einzelne Vektoren vorlagen. In Gerste wurde demonstriert, dass die stabile Integration beider TALEN-Einheiten nicht zwingend notwendig ist, um Mutationen in der Zielregion zu erzeugen (Gurushidze *et al.* 2014). Dies konnte bei der Anwendung in Tabak jedoch nicht gezeigt werden. Im Gegensatz dazu, mussten Kreuzungsversuche unternommen werden, um Pflanzen zu erhalten die beide TALEN-Einheiten enthielten und eine Pflanze mit *gfp*

Mutationen zu detektieren. Dieser Ansatz war im Vergleich zu der gRNA/Cas9 Plattform zeit- und arbeitsaufwändiger, was daraus folgend auch zu höheren Kosten führte. Die Verwendung einer translationalen *Skipping* Sequenz (2A Peptid-Konsensus-Motiv), z.B. aus dem *Thosea asigna* Virus, zum Verlinken der beiden TALEN-Einheiten in einem offenen Leserahmen, würde den Arbeitsaufwand verringern. Mit Hilfe dieses 2A Peptides werden beide Einheiten transkribiert und anschließend während der Translation voneinander getrennt (Donnelly *et al.* 2001). In Reis wurde das *BETAINALDEHYD-DEHYDROGENASE 2* Gen gezielt durch TALENs mutiert, die in einem T2A Vektor prozessiert vorlagen (Shan *et al.* 2015). Neben der Integration beider TALEN-Einheiten spielt natürlich auch das Heraussegregieren der T-DNAs insbesondere bei produktorientierten Anwendungen eine Rolle. Auch bei diesem Aspekt würde die Verwendung eines T2A Vektors Zeit und Kosten sparen, da nur eine anstatt zwei T-DNAs entfernt werden muss. Alternativ zu den T2A Vektoren können auch separate TALEN Expressionskassetten in einer gemeinsamen T-DNA verwendet werden. Aufgrund der hohen Repetitivität der Sequenzen könnte es jedoch hierbei, wie auch bei der translationalen *Skipping* Sequenz, möglicherweise zur Destabilisierung der als Einzelstrang übertragenen T-DNAs kommen.

Die Ergebnisse der gRNA/Cas9-induzierten *gfp* und *Nbcenh3* Mutationen dieser Arbeit wurden mit TALEN-induzierten Mutationen verglichen und zeigten, dass es Unterschiede bei den Mutationstypen gibt. Da mit den *gfp*-spezifischen TALENs nur wenige Mutanten generiert wurden, wurden für den Vergleich zusätzlich Daten aus drei Publikationen (Kim *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013; Li *et al.* 2016) dazugerechnet. Es zeigte sich, dass Insertionen nur selten durch TALENs induziert wurden (3,0 %), während bei den gRNA/Cas9-induzierten Mutationen 17,1 % Insertionen waren. Komplexe Mutationen (diese beinhalten sowohl Substitutionen als auch kombinierte Mutationen) kamen in gleichem Maße bei TALEN- und gRNA/Cas9-induzierten Mutationen vor, während der Anteil an Deletionen bei den TALENs höher war als bei der gRNA/Cas9 (siehe Anhang Abb. A 7a). Kleine Deletionen (mit weniger als 10 bp) wurden durch die gRNA-vermittelte Cas9 häufiger induziert als Deletionen die mehr als 10 bp beinhalteten. Bei den TALEN-induzierten Deletionen war der Unterschied zwischen diesen beiden Kategorien hingegen weniger gravierend (Anhang Abb. A 7b). Während die *FokI* Dimere der TALEN-Einheiten Bruchenden mit Überhängen erzeugen, kommt es bei induzierten DSBs durch die Cas9 zu stumpfen Enden ohne Überhang. Diese unterschiedlichen Bruchenden werden durch verschiedene Mechanismen repariert, woraus die zuvor erwähnten Differenzen bei den Mutationstypen resultieren können.

4.5 Genetische Veränderungen in Pflanzen mittels TALENs und gRNA/Cas9 – Vorschläge zur gesetzlichen Regulierung

TALENs und gRNA-vermittelte Cas9 sind neue Plattformen, die für die genetische Veränderung von verschiedenen Organismen Anwendung finden. Sie sind nicht nur für die Grundlagenforschung hervorragend geeignet, sondern eröffnen auch neue Möglichkeiten in der Pflanzenzüchtung. Der

Einsatz dieser Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen ermöglicht gezielte genetische Veränderungen, die unabhängig von der integrierten T-DNA vererbbar sind. Kleinere Zielsequenz-spezifische Mutationen sind somit nicht von denen zu unterscheiden, die spontan bzw. chemisch oder durch ionisierende Strahlung entstanden sind. Die konventionelle Züchtung, basierend auf Kreuzungen sowie ungerichteter Mutagenese, führt zu zufälligen Veränderungen von bis zu mehreren tausend Nukleotiden. Im Gegensatz dazu finden mit den Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen Veränderungen weitgehend exklusiv an zuvor ausgewählten genomischen Motiven statt. Durch die Beteiligung zelleigener DNA Reparaturmechanismen bei der Entstehung von Mutationen, sollten diese spezifizierbaren Endonukleasen aus wissenschaftlicher Sicht, ähnlich wie mutagene Chemikalien oder radioaktive Strahlung, als mutagenes Agens angesehen werden. Dadurch würden Organismen die mittels Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen genetisch verändert wurden aus dem Anwendungsbereich der deutschen und europäischen Gentechnikgesetzgebung ausgenommen. Grundlage dafür bildet eine Ausnahmeregelung nach der die gesetzliche Regulierung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) nicht auf solche Fälle angewendet wird, bei denen die genetische Veränderung mittels Mutagenese erzeugt wurde.

Aktuell werden Diskussionen darüber geführt, ob diese neuen Methoden des *Genome Engineerings* sowie deren Produkte durch das Gentechnikgesetz reguliert werden sollen. Die Zentrale Kommission für biologische Sicherheit (ZKBS) sowie die *New Technology Working Group* (NTWG) raten dazu, Organismen, die durch Verwendung von anpassbaren Endonukleasen entstanden sind, als nicht gentechnisch veränderte Organismen einzustufen (Lusser *et al.* 2011; ZKBS 2012). Auch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) befindet, dass Organismen, die durch die neuen Techniken des *Genome Engineerings* entstandene Punktmutationen aufweisen, keine GVOs im Sinne der europäischen GVO Richtlinie sind (BVL 2015). So wurde der sogenannte Cibus Raps von der BVL als nicht gentechnisch veränderter Organismus eingestuft und freigegeben, da dieser als Ergebnis der Oligonukleotid gerichteten Mutagenese entstand und somit von der gesetzlichen Regulierung von GVOs ausgenommen ist. Eine endgültige Stellungnahme der Europäischen Kommission zur Regulierung dieser neuen Methoden steht jedoch noch aus. Die positive Beurteilung der Stellungnahmen von ZKBS, NTWG und BVL würde den Einsatz von Zielsequenz-spezifisierten Endonukleasen in der Pflanzenzüchtung zulassen und damit unzählige Möglichkeiten in Hinsicht auf zielgerichtete Mutagenese, Korrektur, Integration, Deletion oder Ersetzen von funktionalen DNA Sequenzen (Hiekel *et al.* 2015) eröffnen.

5 Literaturverzeichnis

- Alwin, S., Gere, M.B., Guhl, E., Effertz, K., Barbas, C.F., 3rd, Segal, D.J., Weitzman, M.D. and Cathomen, T.** (2005). Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol Ther* 12(4): 610-617.
- Barton, K.A., Binns, A.N., Matzke, A.J. and Chilton, M.D.** (1983). Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* 32(4): 1033-1043.
- Belfort, M. and Roberts, R.J.** (1997). Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res* 25(17): 3379-3388.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S. and Nekrasov, V.** (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 9(1): 39.
- Bitinaite, J., Wah, D.A., Aggarwal, A.K. and Schildkraut, I.** (1998). FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10570-10575.
- Black, B.E., Foltz, D.R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V.L., Jr. and Cleveland, D.W.** (2004). Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* 430(6999): 578-582.
- Blower, M.D. and Karpen, G.H.** (2001). The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol* 3(8): 730-739.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U.** (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326(5959): 1509-1512.
- Bogdanove, A.J., Schornack, S. and Lahaye, T.** (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol* 13(4): 394-401.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z.B. and 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.
- Budhagatapalli, N., Rutten, T., Gurushidze, M., Kumlehn, J. and Hensel, G.** (2015). Targeted Modification of Gene Function Exploiting Homology-Directed Repair of TALEN-Mediated Double-Strand Breaks in Barley. *G3 (Bethesda)* 5(9): 1857-1863.
- Budhagatapalli, N., Schedel, S., Gurushidze, M., Pencs, S., Hiekel, S., Rutten, T., Kusch, S., Morbitzer, R., Lahaye, T., Panstruga, R., Kumlehn, J. and Hensel, G.** (2016). A simple test for the cleavage activity of customized endonucleases in plants. *Plant Methods* 12: 18.
- BVL** (2015). Stellungnahme zur gentechnikrechtlichen Einordnung von neuen Pflanzenzüchtungstechniken, insbesondere ODM und CRISPR-Cas9. *B. f. V. u. Lebensmittelsicherheit*.
- Cai, C.Q., Doyon, Y., Ainley, W.M., Miller, J.C., Dekelver, R.C., Moehle, E.A., Rock, J.M., Lee, Y.L., Garrison, R., Schulenberg, L., Blue, R., Worden, A., Baker, L., Faraji, F., Zhang, L., Holmes, M.C., Rebar, E.J., Collingwood, T.N., Rubin-Wilson, B., Gregory, P.D., Urnov, F.D. and Petolino, J.F.** (2009). Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol Biol* 69(6): 699-709.
- Callis, J., Raasch, J.A. and Vierstra, R.D.** (1990). Ubiquitin extension proteins of Arabidopsis thaliana. Structure, localization, and expression of their promoters in transgenic tobacco. *J Biol Chem* 265(21): 12486-12493.

- Catto, L.E., Ganguly, S., Milsom, S.E., Welsh, A.J. and Halford, S.E.** (2006). Protein assembly and DNA looping by the FokI restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res* 34(6): 1711-1720.
- Cermak, T., Baltes, N.J., Cegan, R., Zhang, Y. and Voytas, D.F.** (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* 16: 232.
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F.** (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 39(12): e82.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148): 802-805.
- Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., Xiong, J.W. and Xi, J.J.** (2013). Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res* 23(4): 465-472.
- Char, S.N., Unger-Wallace, E., Frame, B., Briggs, S.A., Main, M., Spalding, M.H., Vollbrecht, E., Wang, K. and Yang, B.** (2015). Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize. *Plant Biotechnol J* 13(7): 1002-1010.
- Chevalier, B.S. and Stoddard, B.L.** (2001). Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res* 29(18): 3757-3774.
- Chilton, M.D. and Que, Q.** (2003). Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiol* 133(3): 956-965.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M. and Kim, J.S.** (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31(3): 230-232.
- Chong, D.K.X., Roberts, W., Arakawa, T., Illes, K., Bagi, G., Slattery, C.W. and Langridge, W.H.R.** (1997). Expression of the human milk protein beta-casein in transgenic potato plants. *Transgenic Res* 6(4): 289-296.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F.** (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186(2): 757-761.
- Christian, M., Qi, Y., Zhang, Y. and Voytas, D.F.** (2013). Targeted Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* Using Engineered TAL Effector Nucleases (TALENs). *G3 (Bethesda)* 3(10): 1697-1705.
- Clasen, B.M., Stoddard, T.J., Luo, S., Demorest, Z.L., Li, J., Cedrone, F., Tibebu, R., Davison, S., Ray, E.E., Daulhac, A., Coffman, A., Yabandith, A., Retterath, A., Haun, W., Baltes, N.J., Mathis, L., Voytas, D.F. and Zhang, F.** (2016). Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J* 14(1): 169-176.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. and Zhang, F.** (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121): 819-823.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S.** (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173(1 Spec No): 33-38.
- Custers, J.B.M., Snepvangers, S.C.H.J., Jansen, H.J., Zhang, L. and Campagne, M.M.V.** (1999). The 35S-CaMV promoter is silent during early embryogenesis but activated during nonembryogenic sporophytic development in microspore culture. *Protoplasma* 208(1-4): 257-264.
- D'Halluin, K., Vanderstraeten, C., Stals, E., Cornelissen, M. and Ruiters, R.** (2008). Homologous recombination: a basis for targeted genome optimization in crop species such as maize. *Plant Biotechnol J* 6(1): 93-102.

- de Pater, S., Pinas, J.E., Hooykaas, P.J. and van der Zaal, B.J.** (2013). ZFN-mediated gene targeting of the Arabidopsis protoporphyrinogen oxidase gene through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol J* 11(4): 510-515.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J. and Charpentier, E.** (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471(7340): 602-607.
- Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J.K., Shi, Y. and Yan, N.** (2012). Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* 335(6069): 720-723.
- Doench, J.G., Hartenian, E., Graham, D.B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B.L., Xavier, R.J. and Root, D.E.** (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol* 32(12): 1262-1267.
- Donnelly, M.L.L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X.J., Hughes, L.E., Gani, D. and Ryan, M.D.** (2001). Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol* 82: 1013-1025.
- Dunwell, J.M.** (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol J* 8(4): 377-424.
- Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y. and Luo, K.** (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Populus in the First Generation. *Sci Rep* 5: 12217.
- Fausser, F., Schiml, S. and 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.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y. and Zhu, J.K.** (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res* 23(10): 1229-1232.
- Feng, Z., Mao, Y., Xu, N., Zhang, B., Wei, P., Yang, D.L., Wang, Z., Zhang, Z., Zheng, R., Yang, L., Zeng, L., Liu, X. and Zhu, J.K.** (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(12): 4632-4637.
- Fichtner, F., Urrea Castellanos, R. and Ulker, B.** (2014). Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement. *Planta* 239(4): 921-939.
- Flores-Ramírez, G., Rivera, M., Morales-Pablos, A., Osuna, J., Soberon, X. and Gaytan, P.** (2007). The effect of amino acid deletions and substitutions in the longest loop of GFP. *BMC Chem Biol* 7: 1.
- Floss, D.M., Kumlehn, J., Conrad, U. and Saalbach, I.** (2009). Haploid technology allows for the efficient and rapid generation of homozygous antibody-accumulating transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J* 7(7): 593-601.
- Forner, J., Pfeiffer, A., Langenecker, T., Manavella, P.A. and Lohmann, J.U.** (2015). Germline-transmitted genome editing in Arabidopsis thaliana Using TAL-effector-nucleases. *Plos One* 10(3): e0121056.
- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K. and Sander, J.D.** (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31(9): 822-826.
- Fu, J.L., Kanno, T., Liang, S.C., Matzke, A.J.M. and Matzke, M.** (2015). GFP Loss-of-Function Mutations in Arabidopsis thaliana. *G3 (Bethesda)* 5(9): 1849-1855.

- Fukuoka, H., Ogawa, T., Matsuoka, M., Ohkawa, Y. and Yano, H.** (1998). Direct gene delivery into isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L) and the production of fertile transgenic plants. *Plant Cell Rep* 17(5): 323-328.
- Gao, F., Shen, X.Z., Jiang, F., Wu, Y. and Han, C.** (2016). DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat Biotechnol* 34(7): 768-773.
- Gao, H., Smith, J., Yang, M., Jones, S., Djukanovic, V., Nicholson, M.G., West, A., Bidney, D., Falco, S.C., Jantz, D. and Lyznik, L.A.** (2010). Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant J* 61(1): 176-187.
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., Wu, Y., Zhao, P. and Xia, Q.** (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* 87(1-2): 99-110.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A. and Lommel, S.A.** (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 21(8): 1015-1026.
- Goodspeed, T.H.** (1954). The genus *Nicotiana*: Origins, relationships and evolution of its species in the light of their distribution, morphology and cytogenetics. *Chronica Botanica*. Waltham, MA, USA: 485-487.
- Gratz, S.J., Cummings, A.M., Nguyen, J.N., Hamm, D.C., Donohue, L.K., Harrison, M.M., Wildonger, J. and O'Connor-Giles, K.M.** (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* 194(4): 1029-1035.
- Gurushidze, M., Hensel, G., Hiekel, S., Schedel, S., Valkov, V. and Kumlehn, J.** (2014). True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *Plos One* 9(3): e92046.
- Gurushidze, M., Hiekel, S., Otto, I., Hensel, G. and Kumlehn, J.** (2016). Site-directed mutagenesis in barley by expression of TALE nuclease in embryogenic pollen. In: *Biotechnologies for plant mutation breeding – Protocols*; J. Jankowicz-Cieslak, T.H. Tai, J. Kumlehn and B.J. Till (Eds). Berlin Heidelberg, Springer Nature, in press.
- Haun, W., Coffman, A., Clasen, B.M., Demorest, Z.L., Lowy, A., Ray, E., Retterath, A., Stoddard, T., Juillerat, A., Cedrone, F., Mathis, L., Voytas, D.F. and Zhang, F.** (2014). Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J* 12(7): 934-940.
- Heim, R., Prasher, D.C. and Tsien, R.Y.** (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 12501-12504.
- Hiekel, S., Schedel, S., Hensel, G., Gurushidze, M., Budhagatapalli, N. and Kumlehn, J.** (2015). Synthetic endonucleases: Novel tools for the site-directed genetic modification of plants. In: *Proc. XXVth Int. Eucarpia Symp. – Section Ornamentals*; International Society for Horticultural Science (ISHS 2015), Leuven, Belgium.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T.** (1985). A Simple and General-Method for Transferring Genes into Plants. *Science* 227(4691): 1229-1231.
- Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P. and Choo, K.H.** (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1148-1153.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G. and Zhang, F.** (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31(9): 827-832.

- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R. and Joung, J.K.** (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31(3): 227-229.
- Hyun, Y., Kim, J., Cho, S.W., Choi, Y., Kim, J.S. and 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.
- Irish, V.F. and Jenik, P.D.** (2001). Cell lineage, cell signaling and the control of plant morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11(4): 424-430.
- Ishii, T., Karimi-Ashtiyani, R., Banaei-Moghaddam, A.M., Schubert, V., Fuchs, J. and Houben, A.** (2015). The differential loading of two barley CENH3 variants into distinct centromeric substructures is cell type- and development-specific. *Chromosome Res* 23(2): 277-284.
- James, D.J., Passey, A.J., Barbara, D.J. and Bevan, M.** (1989). Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rep* 7(8): 658-661.
- Jia, H. and Wang, N.** (2014). Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *Plos One* 9(4): e93806.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B. and Weeks, D.P.** (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* 41(20): e188.
- Jiang, W.Z., Yang, B. and Weeks, D.P.** (2014). Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in *Arabidopsis thaliana* and Inheritance of Modified Genes in the T2 and T3 Generations. *Plos One* 9(6).
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E.** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096): 816-821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. and Doudna, J.** (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2: e00471.
- Karimi-Ashtiyani, R., Ishii, T., Niessen, M., Stein, N., Heckmann, S., Gurushidze, M., Banaei-Moghaddam, A.M., Fuchs, J., Schubert, V., Koch, K., Weiss, O., Demidov, D., Schmidt, K., Kumlehn, J. and Houben, A.** (2015). Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(36): 11211-11216.
- Kasha, K.J. and Kao, K.N.** (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225(5235): 874-876.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U.** (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 318(5850): 648-651.
- Kelliher, T., Starr, D., Wang, W., McCuiston, J., Zhong, H., Nuccio, M.L. and Martin, B.** (2016). Maternal Haploids Are Preferentially Induced by CENH3-tailswap Transgenic Complementation in Maize. *Front Plant Sci* 7: 414.
- Kim, S.R., Lee, J., Jun, S.H., Park, S., Kang, H.G., Kwon, S. and An, G.** (2003). Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol Biol* 52(4): 761-773.
- Kim, Y.G., Cha, J. and 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.
- Kim, Y.K., Wee, G., Park, J., Kim, J., Baek, D., Kim, J.S. and Kim, V.N.** (2013). TALEN-based knockout library for human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 20(12): 1458-1464.

- Klein, T.M., Harper, E.C., Svab, Z., Sanford, J.C., Fromm, M.E. and Maliga, P.** (1988). Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22): 8502-8505.
- Klug, A.** (2010). The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem* 79: 213-231.
- Kumlehn, J.** (2009). Embryogenic pollen culture: a promising target for genetic transformation. In: *Advances in Haploid Production in Higher Plants*; A. Touraev, B.P. Forster and M.S. Jain (Eds). Dordrecht, Netherlands, Springer: 295-305.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D. and Loerz, H.** (2006). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol J* 4(2): 251-261.
- Kuppu, S., Tan, E.H., Nguyen, H., Rodgers, A., Comai, L., Chan, S.W. and Britt, A.B.** (2015). Point Mutations in Centromeric Histone Induce Post-zygotic Incompatibility and Uniparental Inheritance. *PLoS Genet* 11(9): e1005494.
- Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Ostergaard, L., Patron, N., Uauy, C. and Harwood, W.** (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol* 16: 258.
- Leitch, I.J., Hanson, L., Lim, K.Y., Kovarik, A., Chase, M.W., Clarkson, J.J. and Leitch, A.R.** (2008). The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann Bot* 101(6): 805-814.
- Lermontova, I., Schubert, V., Fuchs, J., Klatt, S., Macas, J. and Schubert, I.** (2006). Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell* 18(10): 2443-2451.
- Li, L., Wu, L.P. and Chandrasegaran, S.** (1992). Functional Domains in Fok-I Restriction Endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4275-4279.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M.H., Weeks, D.P. and Yang, B.** (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 30(5): 390-392.
- Li, J.-F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G.M. and Sheen, J.** (2013). Multiplex and HR-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* 31(8): 688-691.
- Li, Z., Liu, Z.B., Xing, A., Moon, B.P., Koellhoffer, J.P., Huang, L., Ward, R.T., Clifton, E., Falco, S.C. and Cigan, A.M.** (2015). Cas9-Guide RNA Directed Genome Editing in Soybean. *Plant Physiol* 169(2): 960-970.
- Li, J., Stoddard, T.J., Demorest, Z.L., Lavoie, P.O., Luo, S., Clasen, B.M., Cedrone, F., Ray, E.E., Coffman, A.P., Daulhac, A., Yabandith, A., Retterath, A.J., Mathis, L., Voytas, D.F., D'Aoust, M.A. and Zhang, F.** (2016). Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production. *Plant Biotechnol J* 14(2): 533-542.
- Lloyd, A., Plaisier, C.L., Carroll, D. and Drews, G.N.** (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(6): 2232-2237.
- Lor, V.S., Starker, C.G., Voytas, D.F., Weiss, D. and Olszewski, N.E.** (2014). Targeted mutagenesis of the tomato PROCERA gene using transcription activator-like effector nucleases. *Plant Physiol* 166(3): 1288-1291.
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D. and Rodriguez-Cerezo, E.** (2011). New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development. Brussels, European Commission Joint Research Centre. *Joint Research Centre Technical Report* EUR 24760.

- 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. and 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.
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y. and Liu, Y.G.** (2016). CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Mol Plant* 9(7): 961-974.
- Maeder, M.L., Thibodeau-Beganny, S., Osiaik, 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., Muller-Lerch, F., Fu, F., Pearlberg, J., Gobel, C., Dassie, J.P., Pruett-Miller, S.M., Porteus, M.H., Sgroi, D.C., Iafrate, A.J., Dobbs, D., McCray, P.B., Jr., Cathomen, T., Voytas, D.F. and Joung, J.K.** (2008). Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell* 31(2): 294-301.
- Mahfouz, M.M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X. and Zhu, J.K.** (2011). De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2623-2628.
- Mahfouz, M.M., Piatek, A. and Stewart, C.N., Jr.** (2014). Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnol J* 12(8): 1006-1014.
- Mak, A.N., Bradley, P., Cernadas, R.A., Bogdanove, A.J. and Stoddard, B.L.** (2012). The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* 335(6069): 716-719.
- Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., van der Oost, J. and Koonin, E.V.** (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9(6): 467-477.
- Mao, Y., Zhang, H., Xu, N., Zhang, B., Gou, F. and Zhu, J.K.** (2013). Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant* 6(6): 2008-2011.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U.** (2002). The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact* 15(7): 637-646.
- Marton, I., Zuker, A., Shklarman, E., Zeevi, V., Tovkach, A., Roffe, S., Ovadis, M., Tzfira, T. and Vainstein, A.** (2010). Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol* 154(3): 1079-1087.
- Mashal, R.D., Koontz, J. and Sklar, J.** (1995). Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. *Nat Genet* 9(2): 177-183.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R. and Fraley, R.** (1986). Leaf Disk Transformation of Cultivated Tomato (*Lycopersicon-Esculentum*) Using *Agrobacterium-Tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 5(2): 81-84.
- Miller, J., Mclachlan, A.D. and Klug, A.** (1985). Repetitive Zinc-Binding Domains in the Protein Transcription Factor Iiia from *Xenopus* Oocytes. *Embo Journal* 4(6): 1609-1614.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., Dulay, G.P., Hua, K.L., Ankoudinova, I., Cost, G.J., Urnov, F.D., Zhang, H.S., Holmes, M.C., Zhang, L., Gregory, P.D. and Rebar, E.J.** (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29(2): 143-148.
- Moscou, M.J. and Bogdanove, A.J.** (2009). A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science* 326(5959): 1501.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lutge, F., Dannemann, N., Lahaye, T. and Cathomen, T.** (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res* 39(21): 9283-9293.

- Nagaki, K., Kashihara, K. and Murata, M.** (2009). A centromeric DNA sequence colocalized with a centromere-specific histone H3 in tobacco. *Chromosoma* 118(2): 249-257.
- Nagaki, K., Terada, K., Wakimoto, M., Kashihara, K. and Murata, M.** (2010). Centromere targeting of alien CENH3s in Arabidopsis and tobacco cells. *Chromosome Res* 18(2): 203-211.
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J.D.G. and Kamoun, S.** (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31(8): 691-693.
- Oleykowski, C.A., Mullins, C.R.B., Godwin, A.K. and Yeung, A.T.** (1998). Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Research* 26(20): 4597-4602.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. and Remington, S.J.** (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273(5280): 1392-1395.
- Osakabe, K., Osakabe, Y. and Toki, S.** (2010). Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(26): 12034-12039.
- Pallotta, M.A., Graham, R.D., Langridge, P., Sparrow, D.H.B. and Barker, S.J.** (2000). RFLP mapping of manganese efficiency in barley. *Theor Appl Genet* 101(7): 1100-1108.
- Pan, C., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y., Wang, J., Chen, L. and Lu, G.** (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Sci Rep* 6: 24765.
- Perrin, A., Buckle, M. and 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.
- Porteus, M.H. and Baltimore, D.** (2003). Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 300(5620): 763.
- Prieto, J., Redondo, P., Padro, D., Arnould, S., Epinat, J.C., Paques, F., Blanco, F.J. and Montoya, G.** (2007). The C-terminal loop of the homing endonuclease I-CreI is essential for site recognition, DNA binding and cleavage. *Nucleic Acids Res* 35(10): 3262-3271.
- Puchta, H., Dujon, B. and 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. and Fauser, F.** (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant J* 78(5): 727-741.
- Qiu, P., Shandilya, H., D'Alessio, J.M., O'Connor, K., Durocher, J. and Gerard, G.F.** (2004). Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques* 36(4): 702-707.
- Ran, F.A., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Sharp, P.A. and Zhang, F.** (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520(7546): 186-191.
- Ravi, M. and Chan, S.W.** (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464(7288): 615-618.
- Ravi, M., Kwong, P.N., Menorca, R.M., Valencia, J.T., Ramahi, J.S., Stewart, J.L., Tran, R.K., Sundaresan, V., Comai, L. and Chan, S.W.** (2010). The rapidly evolving centromere-specific histone has stringent functional requirements in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 186(2): 461-471.
- Ravi, M., Shibata, F., Ramahi, J.S., Nagaki, K., Chen, C., Murata, M. and Chan, S.W.** (2011). Meiosis-specific loading of the centromere-specific histone CENH3 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 7(6): e1002121.

- Rotino, G.L. and Gleddie, S.** (1990). Transformation of Eggplant (*Solanum-Melongena* L) Using a Binary *Agrobacterium-Tumefaciens* Vector. *Plant Cell Rep* 9(1): 26-29.
- Sanei, M., Pickering, R., Kumke, K., Nasuda, S. and Houben, A.** (2011). Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *PNAS* 108(33): 8.
- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D. and Allen, N.** (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Sci Tech* 5(1): 27-37.
- Sangwan, R.S., Ducrocq, C. and Sangwannorreel, B.** (1993). *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Pollen Embryos in *Datura-Innoxia* and *Nicotiana-Tabacum* - Production of Transgenic Haploid and Fertile Homozygous Dihaploid Plants. *Plant Science* 95(1): 99-115.
- Schaefer, D.G.** (2002). A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Plant Biol* 53: 477-501.
- Schiml, S., Fauser, F. and Puchta, H.** (2014). The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J* 80(6): 1139-1150.
- Schmidt, R. and Willmitzer, L.** (1988). High-Efficiency *Agrobacterium-Tumefaciens*-Mediated Transformation of *Arabidopsis-Thaliana* Leaf and Cotyledon Explants. *Plant Cell Rep* 7(7): 583-586.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qui, J.-L. and Gao, C.** (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnology* 31(8): 686-688.
- Shan, Q., Zhang, Y., Chen, K., Zhang, K. and Gao, C.** (2015). Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J* 13(6): 791-800.
- Shen, B., Zhang, J., Wu, H., Wang, J., Ma, K., Li, Z., Zhang, X., Zhang, P. and Huang, X.** (2013). Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res* 23(5): 720-723.
- Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.C., DeKolver, R.C., Moehle, E.A., Worden, S.E., Mitchell, J.C., Arnold, N.L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V.M., Rock, J.M., Wu, Y.Y., Katibah, G.E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M.A., Blakeslee, B., Greenwalt, S.A., Butler, H.J., Hinkley, S.J., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D. and Urnov, F.D.** (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459(7245): 437-441.
- Siebert, R. and 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.
- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A. and Hawes, C.** (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* 1(4): 2019-2025.
- Sugisaki, H. and Kanazawa, S.** (1981). New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanoikoites* (FokI) and *Micrococcus luteus* (MluI). *Gene* 16(1-3): 73-78.
- Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., Guo, X., Du, W., Zhao, Y. and Xia, L.** (2016). Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. *Mol Plant* 9(4): 628-631.
- Svitashev, S., Young, J.K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S.C. and 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.

- Swarts, D.C., Makarova, K., Wang, Y., Nakanishi, K., Ketting, R.F., Koonin, E.V., Patel, D.J. and van der Oost, J. (2014). The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol* 21(9): 743-753.
- Szcepek, M., Brondani, V., Buchel, J., Serrano, L., Segal, D.J. and Cathomen, T. (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 25(7): 786-793.
- Tinland, B. (1996). The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci* 1(6): 178-184.
- Tovkach, A., Zeevi, V. and Tzfira, T. (2009). A toolbox and procedural notes for characterizing novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells. *Plant J* 57(4): 747-757.
- Townsend, J.A., Wright, D.A., Winfrey, R.J., Fu, F., Maeder, M.L., Joung, J.K. and Voytas, D.F. (2009). High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459(7245): 442-445.
- Upadhyay, S.K., Kumar, J., Alok, A. and Tuli, R. (2013). RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda)* 3(12): 2233-2238.
- Valton, J., Dupuy, A., Daboussi, F., Thomas, S., Marechal, A., Macmaster, R., Melliand, K., Juillerat, A. and Duchateau, P. (2012). Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J Biol Chem* 287(46): 38427-38432.
- Voytas, D.F. (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol* 64: 327-350.
- Wah, D.A., Bitinaite, J., Schildkraut, I. and Aggarwal, A.K. (1998). Structure of FokI has implications for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10564-10569.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F. and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153(4): 910-918.
- Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M. and Lander, E.S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343(6166): 80-84.
- Wang, X. and Bennetzen, J.L. (2015). Current status and prospects for the study of Nicotiana genomics, genetics, and nicotine biosynthesis genes. *Mol Genet Genomics* 290(1): 11-21.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. and Qiu, J.L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32(9): 947-951.
- Wang, Z.P., Xing, H.L., Dong, L., Zhang, H.Y., Han, C.Y., Wang, X.C. and 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.
- Warburton, P.E., Cooke, C.A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B.A., Stetten, G., Gimelli, G., Warburton, D., Tyler-Smith, C., Sullivan, K.F., Poirier, G.G. and Earnshaw, W.C. (1997). Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol* 7(11): 901-904.
- Waterworth, W.M., Drury, G.E., Bray, C.M. and West, C.E. (2011). Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytol* 192(4): 805-822.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H. and Doudna, J.A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482(7385): 331-338.
- Wilkinson, J.E., Twell, D. and Lindsey, K. (1997). Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: Implications for field release of transgenic plants. *J Exp Bot* 48(307): 265-275.

- Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G. and Pryor, R.J.** (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 49(6 Pt 1): 853-860.
- Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S.I., Corvalan, C., Cho, S.W., Kim, H., Kim, S.G., Kim, S.T., Choe, S. and Kim, J.S.** (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33(11): 1162-1164.
- Wright, D.A., Townsend, J.A., Winfrey, R.J., Jr., Irwin, P.A., Rajagopal, J., Lonosky, P.M., Hall, B.D., Jondle, M.D. and Voytas, D.F.** (2005). High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J* 44(4): 693-705.
- Xie, K., Zhang, J. and Yang, Y.** (2014). Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Mol Plant* 7(5): 923-926.
- Xing, H.L., Dong, L., Wang, Z.P., Zhang, H.Y., Han, C.Y., Liu, B., Wang, X.C. and Chen, Q.J.** (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol* 14: 327.
- Xu, R.F., Li, H., Qin, R.Y., Li, J., Qiu, C.H., Yang, Y.C., Ma, H., Li, L., Wei, P.C. and Yang, J.B.** (2015). Generation of inheritable and "transgene clean" targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 5: 11491.
- Yang, F., Moss, L.G. and Phillips, G.N.** (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnol* 14(10): 1246-1251.
- Yan, W., Chen, D. and Kaufmann, K.** (2016). Efficient multiplex mutagenesis by RNA-guided Cas9 and its use in the characterization of regulatory elements in the AGAMOUS gene. *Plant Methods* 12: 23.
- Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E.V. and Zhang, F.** (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163(3): 759-771.
- Zhang, F., Maeder, M.L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J.P., Reyon, D., Christian, M., Li, X.H., Pierick, C.J., Dobbs, D., Peterson, T., Joung, J.K. and Voytas, D.F.** (2010). High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(26): 12028-12033.
- Zhang, Y., Zhang, F., Li, X., Baller, J.A., Qi, Y., Starker, C.G., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F.** (2013). Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol* 161(1): 20-27.
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N. and Zhu, J.K.** (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J* 12(6): 797-807.
- Zhang, H., Gou, F., Zhang, J., Liu, W., Li, Q., Mao, Y., Botella, J.R. and Zhu, J.K.** (2016). TALEN-mediated targeted mutagenesis produces a large variety of heritable mutations in rice. *Plant Biotechnol J* 14(1): 186-194.
- Zhang, Y., Liang, Z., Zong, Y., Wang, Y., Liu, J., Chen, K., Qiu, J.L. and Gao, C.** (2016). Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun* 7: 12617.
- Zhao, Y., Zhang, C., Liu, W., Gao, W., Liu, C., Song, G., Li, W.X., Mao, L., Chen, B., Xu, Y., Li, X. and Xie, C.** (2016). An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design. *Sci Rep* 6: 23890.
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D.P., Spalding, M.H. and Yang, B.** (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res* 42(17): 10903-10914.

ZKBS (2012). Position statement of the ZKBS on new plant breeding techniques. *Z. K. f. b. Sicherheit*.
http://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/04_Fachmeldungen/2013/2013_08_01_Fa_neue_Techniken_Pflanzenzuechtung.html%3fn%3d1471850.

6 Anhang

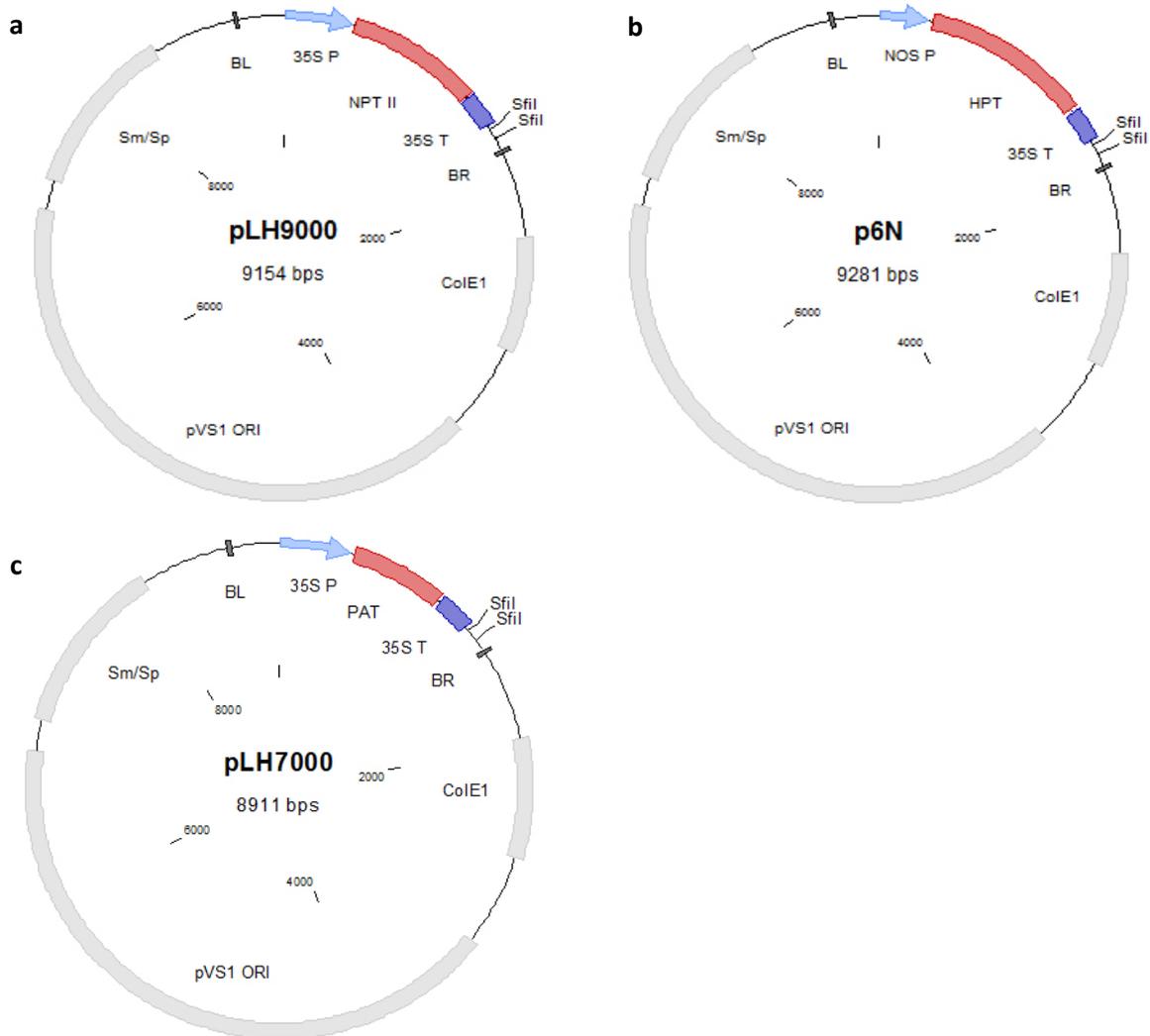


Abb. A 1: Karten der Binärvektoren pLH9000, p6N und pLH7000. a) pLH9000 wurde für die Klonierung des Transformationsvektors pGH292 verwendet. b) p6N wurde für die Klonierung der TALEN Vektoren verwendet. c) pLH7000 wurde für die Klonierung der Komplementationskonstrukte verwendet. LB: linke Abgrenzung der T-DNA (*Left Border*); RB: rechte Abgrenzung der T-DNA (*Right Border*); 35S P: Promotersequenz des *CaMV 35S*; NPT II: *NEOMYCIN-PHOSPHOTRANSFERASE II* Gen aus *E. coli* (vermittelt Resistenz gegen Kanamycin); 35S T: terminale Sequenz des *CaMV 35S*; NOS P: *A. tumefaciens* Promotersequenz des *NOPALIN-SYNTHASE* Gens; HPT: *HYGROMYCIN-PHOSPHOTRANSFERASE* Gen aus *E. coli*; PAT: *PHOSPHINOTHRICIN-ACETYLTRANSFERASE* Gen aus *Streptomyces viridochromogenes*; Sm/Sp: *STREPTOMYCIN/SPECTINOMYCIN* Resistenzgen; ColE1: Colicin E1 Replikationsursprung; pVS1 ORI: Replikationsursprung aus *Pseudomonas*.

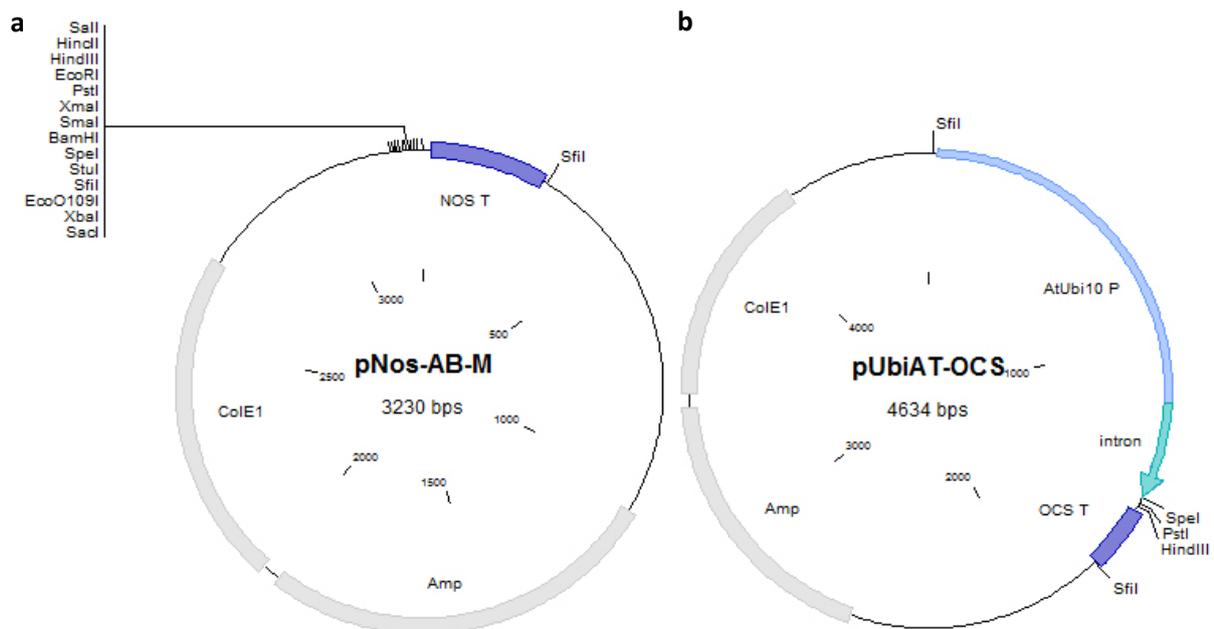


Abb. A 2: Karten der Ausgangsvektoren pNos-AB-M und pUbiAT-OCS. a) Vektor pNos-AB-M wurde als Grundlage für die Klonierung diverser Zwischenvektoren verwendet. b) pUbiAT-OCS wurde für die Klonierung der TALEN Vektoren verwendet. NOS T: terminale Sequenz des *NOPALIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*; AtUbi10 P: *UBIQUITIN-10* Promoter von *A. thaliana* (mit Intron); OCS T: terminale Sequenz des *OCTOPIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*; Amp: *AMPICILLIN* Resistenzgen; ColE1: Colicin E1 Replikationsursprung.

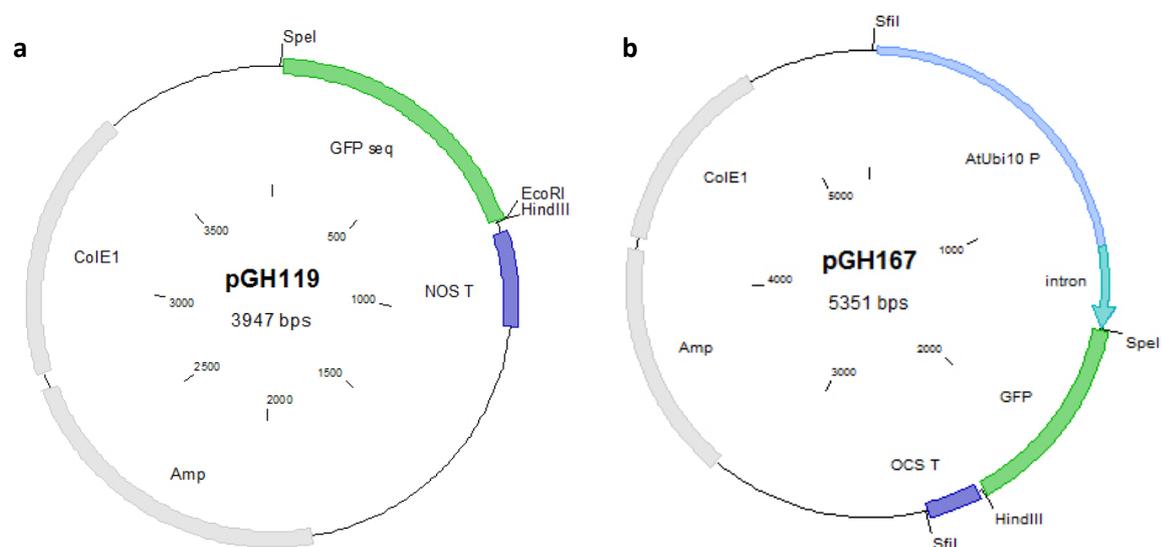


Abb. A 3: Karten der Zwischenvektoren pGH119 (a) und pGH167 (b). Gezeigt sind zwei der Zwischenvektoren die während der Klonierung des Transformationsvektors pGH292 entstanden sind. GFP: synthetisches Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (*Green Fluorescent Protein*); NOS T: terminale Sequenz des *NOPALIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*; AtUbi10 P: *UBIQUITIN-10* Promoter von *A. thaliana* (mit Intron); OCS T: terminale Sequenz des *OCTOPIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens*; Amp: *AMPICILLIN* Resistenzgen; ColE1: Colicin E1 Replikationsursprung.

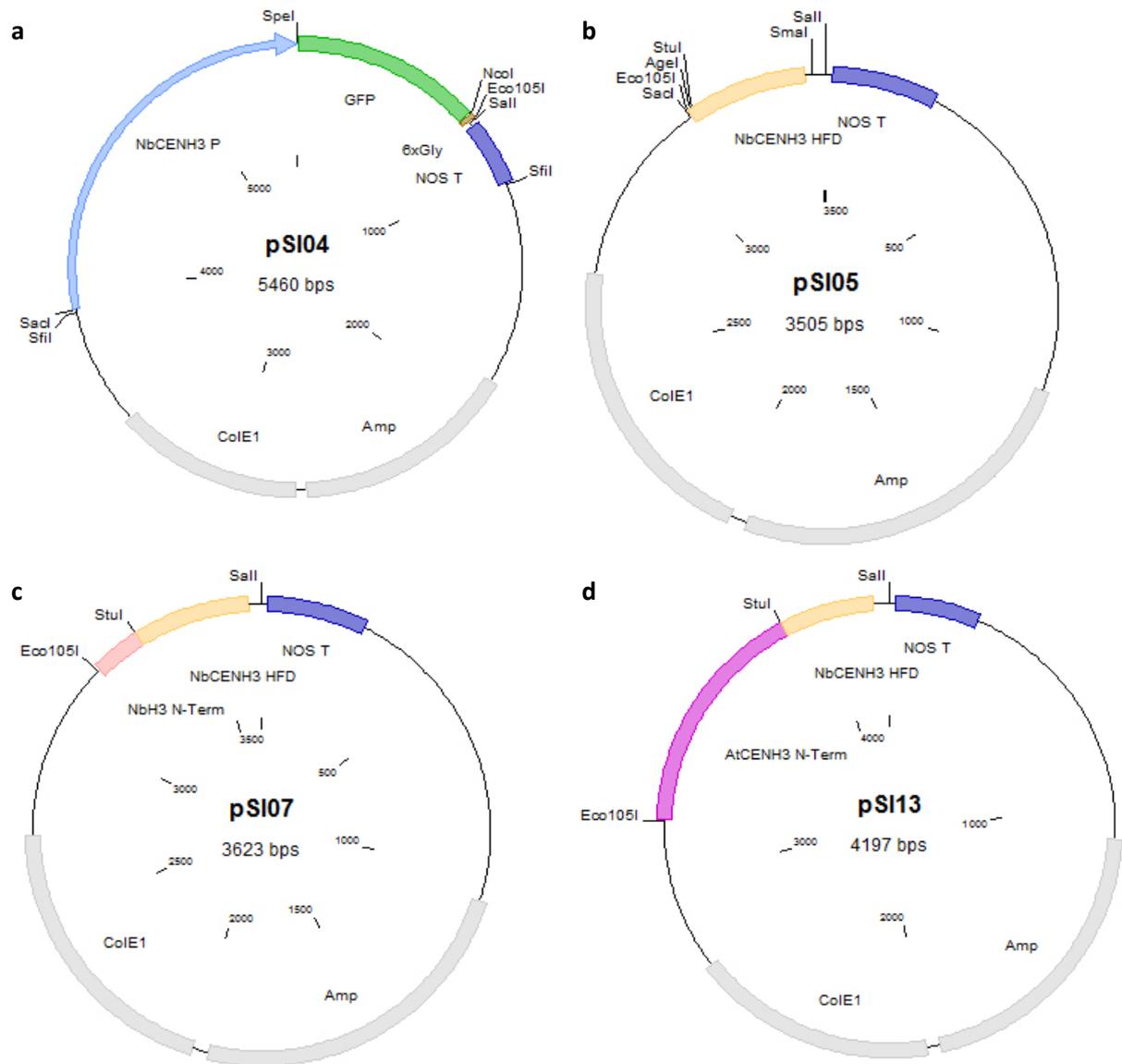


Abb. A 4: Karten der Zwischenvektoren pSI04 (a), pSI05 (b), pSI07 (c) und pSI13 (d). Gezeigt sind vier der Zwischenvektoren die während der Klonierung der beiden Komplementationskonstrukte NbH3-tailswap (pSI11) und AtCENH3-tailswap (pSI15) entstanden sind. NbCENH3 P: Promotersequenz des *CENH3* Gens aus *N. benthamiana*; GFP: synthetisches Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (*Green Fluorescent Protein*); 6xGly: Glycin-Linker bestehend aus sechs mal Glycin; NOS T: terminale Sequenz des *NOPALIN-SYNTHASE* Gens aus *A. tumefaciens.*; NbCENH3 HFD: Histonfaltungsdomäne des *CENH3* Gens aus *N. benthamiana*; N-Term NbH3: N-Terminus des kanonischen Histons H3 aus *N. benthamiana*; N-Term AtCENH3: N-Terminus des *CENH3* Gens aus *A. thaliana*; Amp: AMPICILLIN Resistenzgen; ColE1: Colicin E1 Replikationsursprung.

<i>gfp</i> WT	CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG R I E L K G I D F K E D G N I L 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137	
125-P58-01	CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACGGCAAGGAGGACGGCAACATCCTG R I E L K G I D G K E D G N I L	F130G
125-14-01	CGCATCGAGCTGAAGGGCAT---CTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG R I E L K G I - F K E D G N I L	ΔD129
126-40-06	CGCATCGAGCTGAAGGGCATCG---TCAAGGAGGACGGCAACATCCTG R I E L K G I - V K E D G N I L	ΔD129/F130V
254-08-12	-----ACATCCTG - - - - - D I L	Δ18aa/N135D
125-P61-05	----- - - - - -	Δ76aa
126-05-04	CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC-TCAAGGAGGACGGCAACATCCTG R I E L K G I D S R R T A T S	KO Mutante
125-SC03-02	CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG R I E L K G I D F Q G G R Q H P	KO Mutante

Abb. A 5: Ausgewählte gRNA/Cas9-induzierte *gfp* Mutationen und deren Aminosäuresequenzen. Die jeweils erste Zeile einer Pflanze zeigt die *gfp* Zielregion, während die zweite Zeile die entsprechende Aminosäuresequenz repräsentiert. Beim *gfp* WT ist in der dritten Zeile zusätzlich die Nummerierung der Aminosäuren angegeben. Die blau markierte Sequenz repräsentiert die *Protospacer* Sequenz, die in grün die *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM). Deletionen sind mit roten Bindestrichen, Insertionen durch rote Buchstaben hervorgehoben. Die jeweilige Veränderung der Aminosäuresequenz befindet sich auf der rechten Seite der Sequenzen; KO Mutante: Knock-out Mutante durch die Verschiebung des translationalen Leserahmens.

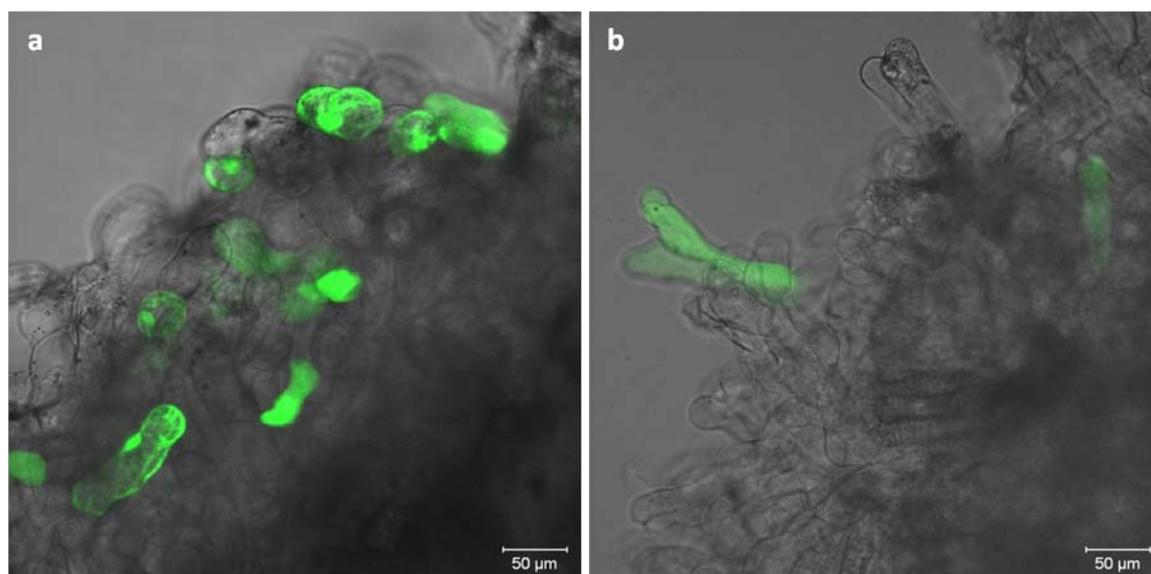


Abb. A 6: Vergleich von GFP Fluoreszenzen in Tabakkallusen nach der Expression mit unterschiedlichen Promotoren. Repräsentative Epifluoreszenz in transgenen Tabakzellen aus Kallusgewebe einen Tag nach dem Partikelbeschuss mit der jeweiligen *gfp* Expressionskassette. a) GFP Fluoreszenz nach Beschuss mit d35SP::*GFP*, b) GFP Fluoreszenz nach Beschuss mit AtUbi10P::*GFP*.

Tab. A 1: Häufigkeit von Mutationen unter Nachkommen, die durch Selbstbestäubung von ausgewählten T₁ *gfp* Mutanten produziert wurden.

Bezeichnung T ₀ Pflanze	#125-14	#125-19	#126-40	#254-08	#125-P61	Ø
Anz. untersuchter T ₂ Pflanzen	14	14	12	15	14	13,8
T ₂ <i>gfp</i> WT Pflanzen	0 % (0)	0 % (0)	8,3 % (1)	0 % (0)	0 % (0)	1,7 % (0,2)
T ₂ heterozygote/chimäre Mutanten	35,7 % (5)	64,3 % (9)	75,0 % (9)	80,0 % (12)	50,0 % (7)	61,0 % (8,4)
T ₂ homozygote Mutanten	64,3 % (9)	35,7 % (5)	16,7 % (2)	20,0 % (3)	50,0 % (7)	41,3 % (5,2)
Anz. detektierter Mutationen in T ₁	2	2	1	2	1	1,6
Anz. detektierter Mutationen in T ₂	5	2	2	2	2	2,6
a) Anz. Mutationen die in T ₁ und T ₂ detektiert wurden	1	2	1	2	1	1,4
b) Anz. Mutationen die in T ₂ aber nicht in T ₁ detektiert wurden	4	0	1	0	1	1,2

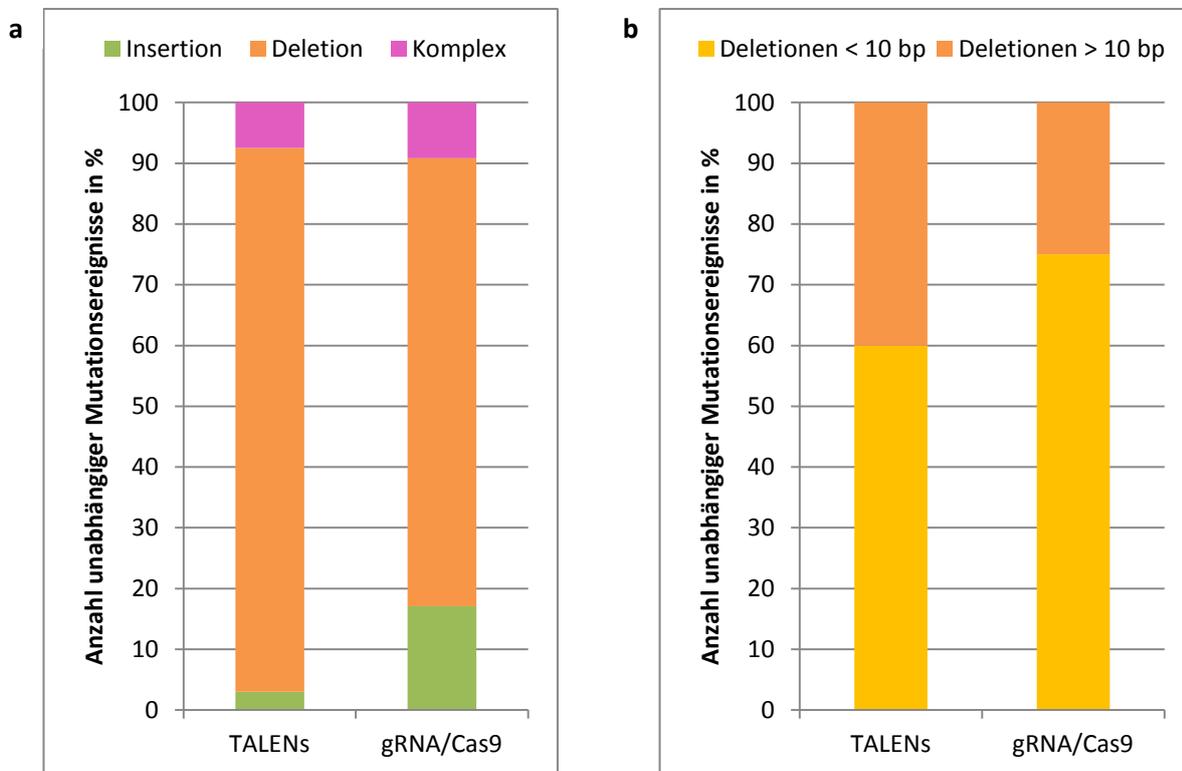


Abb. A 7: Vergleich von TALEN- und gRNA/Cas9-induzierten Mutationstypen. a) Vergleich der Mutationstypen Insertionen, Deletionen und komplexe Mutationen (diese beinhalten sowohl Substitutionen als auch kombinierte Mutationen). Die Gesamtzahl unabhängiger Mutationsereignisse bei TALENs beträgt n=67, für gRNA/Cas9 ist n=76. Daten für die Ergebnisse der TALENs stammen aus den in dieser Arbeit induzierten *gfp* Mutationen sowie den Angaben aus drei Publikationen (Kim *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013; Li *et al.* 2016). Für die gRNA/Cas9 wurden die vorliegenden Daten von induzierten Mutationen im *gfp* und *Nbcenth3* zusammengefasst. b) Vergleich der Größe von TALEN- und gRNA/Cas9-induzierten Deletionen. Es wurde derselbe Datensatz wie zuvor verwendet mit n=60 für TALENs und n=56 für gRNA/Cas9. Die jeweilige y-Achse repräsentiert die Anzahl unabhängiger Mutationsereignisse in Prozent [%].

Tab. A 2: Übersicht der PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten F₂ Individuen von F₁ Pflanze #X-9.

Bezeichnung Pflanze	PCR TALEN-L	PCR TALEN-R	PCR FokI	Modifikation in bp	Zygotie	Bezeichnung Pflanze	PCR TALEN-L	PCR TALEN-R	PCR FokI	Modifikation in bp	Zygotie
#X-9-01	-	+	+	WT	homozygot	#X-9-26	-	+	+	Kein <i>gfp!</i>	-
#X-9-02	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-27	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-03	-	-	-	WT	homozygot	#X-9-28	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-04	+	-	+	+1 bp, WT	heterozygot	#X-9-29	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-05	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-30	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-06	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-31	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-07	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-32	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-08	-	+	+	WT	homozygot	#X-9-33	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-09	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-34	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-10	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-35	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-11	+	-	+	-5 bp	homozygot	#X-9-36	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-12	-	+	+	WT	homozygot	#X-9-37	-	+	+	Kein <i>gfp!</i>	-
#X-9-13	-	+	+	WT	homozygot	#X-9-38	-	+	+	Kein <i>gfp!</i>	-
#X-9-14	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-39	-	+	+	Kein <i>gfp!</i>	-
#X-9-15	-	+	+	WT	homozygot	#X-9-40	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-16	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-41	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-17	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-42	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-18	+	-	+	Kein <i>gfp!</i>	-	#X-9-43	+	-	+	-15 bp	homozygot
#X-9-19	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-44	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-20	+	-	+	WT	homozygot	#X-9-45	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-21	-	-	-	WT	homozygot	#X-9-46	-	+	+	Kein <i>gfp!</i>	-
#X-9-22	-	-	-	-1 bp, WT	heterozygot	#X-9-47	-	+	+	Kein <i>gfp!</i>	-
#X-9-23	-	+	+	WT	homozygot	#X-9-48	-	+	+	WT	homozygot
#X-9-24	-	+	+	WT	homozygot	#X-9-49	+	-	+	Kein <i>gfp!</i>	-
#X-9-25	-	+	+	Kein <i>gfp!</i>	-	#X-9-50	-	+	+	Kein <i>gfp!</i>	-

Tab. A 3: Übersicht der PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten somatischen Klone von F₁ Pflanze #X-9.

Bezeichnung Pflanze	PCR TALEN-L	PCR TALEN-R	PCR <i>FokI</i>	Modifikation des <i>gfp</i> in bp	Zygotie
#X-9-SC01	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC02	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC03	+	-	+	-1 bp, -15 bp, WT	chimär
#X-9-SC04	x	x	x	x	x
#X-9-SC05	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC06	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC07	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC08	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC09	-	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC10	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC11	-	-	-	WT	homozygot
#X-9-SC12	-	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC13	-	-	-	WT	homozygot
#X-9-SC14	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC15	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC16	+	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC17	-	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC18	-	-	+	WT	homozygot
#X-9-SC19	-	-	+	WT	homozygot

Tab. A 4: Übersicht der Kreuzungspartner zur Erzeugung von Pflanzen mit beiden *NbCENH3*-spezifischen TALEN-Einheiten und einem CENH3-Derivat.

Kreuzung Nummer	weiblich		x		männlich	Kreuzung Nummer	weiblich		x		männlich
I	NbH3-ts	#10	x	#37	TALEN-L + TALEN-R	XXIII	TALEN-L + TALEN-R	#45	x	#30	AtCENH3-ts
II	NbH3-ts	#11	x	#45	TALEN-L + TALEN-R	XXIV	TALEN-L + TALEN-R	#45	x	#55	AtCENH3-ts
III	NbH3-ts	#13	x	#51	TALEN-L + TALEN-R	XXV	AtCENH3-ts	#46	x	#37	TALEN-L + TALEN-R
IV	NbH3-ts	#15	x	#51	TALEN-L + TALEN-R	XXVI	AtCENH3-ts	#46	x	#51	TALEN-L + TALEN-R
V	TALEN-L	#18	x	#38	AtCENH3-ts + TALEN-R	XXVII	AtCENH3-ts + TALEN-L	#47	x	#24	TALEN-R
VI	TALEN-L	#19	x	#38	AtCENH3-ts + TALEN-R	XXVIII	AtCENH3-ts + TALEN-L	#47	x	#29	TALEN-R
VII	TALEN-R	#24	x	#47	AtCENH3-ts + TALEN-L	XXIX	TALEN-L + TALEN-R	#51	x	#13	NbH3-ts
VIII	TALEN-L	#28	x	#38	AtCENH3-ts + TALEN-R	XXX	TALEN-L + TALEN-R	#51	x	#15	NbH3-ts
IX	TALEN-R	#29	x	#47	AtCENH3-ts + TALEN-L	XXXI	TALEN-L + TALEN-R	#51	x	#36	AtCENH3-ts
X	AtCENH3-ts	#30	x	#37	TALEN-L + TALEN-R	XXXII	TALEN-L + TALEN-R	#51	x	#46	AtCENH3-ts
XI	AtCENH3-ts	#30	x	#45	TALEN-L + TALEN-R	XXXIII	AtCENH3-ts	#55	x	#45	TALEN-L + TALEN-R
XII	AtCENH3-ts	#36	x	#37	TALEN-L + TALEN-R	XXXIV	AtCENH3-ts + TALEN-L	#65	x	#72	TALEN-R
XIII	AtCENH3-ts	#36	x	#51	TALEN-L + TALEN-R	XXXV	AtCENH3-ts + TALEN-L	#66	x	#69	TALEN-R
XIV	TALEN-L + TALEN-R	#37	x	#10	NbH3-ts	XXXVI	TALEN-R	#69	x	#66	AtCENH3-ts + TALEN-L
XV	TALEN-L + TALEN-R	#37	x	#14	NbH3-ts	XXXVII	TALEN-R	#72	x	#65	AtCENH3-ts + TALEN-L
XVI	TALEN-L + TALEN-R	#37	x	#30	AtCENH3-ts	XXXVIII	TALEN-L	#63	x	#87	NbH3-ts + TALEN-R
XVII	TALEN-L + TALEN-R	#37	x	#46	AtCENH3-ts	XL	AtCENH3-ts + TALEN-L	#78	x	#81	TALEN-R
XVIII	AtCENH3-ts + TALEN-R	#38	x	#18	TALEN-L	XLI	TALEN-R	#81	x	#78	AtCENH3-ts + TALEN-L
XIX	AtCENH3-ts + TALEN-R	#38	x	#28	TALEN-L	XLII	TALEN-R	#82	x	#83	AtCENH3-ts + TALEN-L
XX	AtCENH3-ts	#39	x	#37	TALEN-L + TALEN-R	XLIII	NbH3-ts + TALEN-R	#87	x	#63	TALEN-L
XXI	TALEN-L + TALEN-R	#45	x	#11	NbH3-ts	XLIV	NbH3-ts	#88	x	#51	TALEN-L + TALEN-R
XXII	TALEN-L + TALEN-R	#45	x	#14	NbH3-ts	XLV	NbH3-ts	#90	x	#51	TALEN-L + TALEN-R

Tab. A 5: Übersicht über die PCR- und Sequenzierungsergebnisse von Pflanzen aus vegetativer Erhaltung, die von ausgewählten Kreuzungsnachkommen mit beiden *NbCENH3*-spezifischen TALEN-Einheiten regeneriert wurden.

Bezeichnung Pflanze	PCR TALEN-L	PCR TALEN-R	Modifikation in bp	Bezeichnung Pflanze	PCR TALEN-L	PCR TALEN-R	Modifikation in bp
#II-1-SC01	+	-	WT	#XIII-2-SC01	+	+	WT
#II-1-SC02	+	-	WT	#XIII-2-SC02	+	+	WT
#II-1-SC03	+	-	WT	#XIII-2-SC03	+	-	WT
#II-1-SC04	+	-	WT	#XIII-2-SC04	+	+	WT
#II-1-SC05	+	+	WT	#XIII-2-SC05	+	+	WT
#II-1-SC06	+	+	WT	#XIII-2-SC06	+	+	WT
#II-1-SC07	+	-	WT	#XIII-2-SC07	+	+	WT
#II-1-SC08	+	-	WT	#XIII-2-SC08	+	+	WT
#II-1-SC09	+	-	WT	#XIII-2-SC09	+	+	WT
#II-1-SC10	+	-	WT	#XIII-2-SC10	+	-	WT
#II-1-SC11	+	+	WT	#XIII-2-SC11	+	+	WT
#II-1-SC12	+	+	WT	#XIII-2-SC12	+	-	WT
#II-1-SC13	+	-	WT	#XIII-2-SC13	+	+	WT
#II-1-SC14	+	+	WT	#XIII-2-SC14	+	+	WT
#II-1-SC15	+	-	WT	#XVII-6-SC02	-	+	WT
#II-1-SC16	+	-	WT	#XVII-6-SC03	-	+	WT
#II-1-SC17	+	+	WT	#XVII-6-SC04	-	+	WT
#II-1-SC18	-	-	WT	#XVII-6-SC05	-	+	WT
#II-1-SC19	+	+	WT	#XVII-6-SC06	-	+	WT
#II-1-SC20	-	-	WT	#XVII-6-SC07	-	+	WT
#II-1-SC21	+	+	WT	#XXIII-5-SC02	+	+	WT
#XXIX-3-SC01	-	+	WT	#XXIII-5-SC03	+	+	WT
#XXIX-3-SC02	-	+	WT				

Tab. A 6: Übersicht der PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten T₁ Individuen von T₀ Pflanze #125.

Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	Modifikation in bp	Zygotie	Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	Modifikation in bp	Zygotie
125-01	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-26	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-02	+	+1 bp	homozygot	125-27	+	+1 bp	homozygot
125-03	+	+1 bp	homozygot	125-28	-	+1 bp	homozygot
125-04	-	+ 1bp, WT	heterozygot	125-29	+	+1 bp	homozygot
125-05	-	+1 bp	homozygot	125-30	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-06	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-31	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-07	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot	125-32	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-08	+	+1 bp	homozygot	125-33	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-09	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-34	+	+1 bp	homozygot
125-10	+	WT	homozygot	125-35	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-11	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-36	+	+1 bp	homozygot
125-12	-	WT	homozygot	125-37	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-13	+	+1 bp	homozygot	125-38	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-14	+	-3 bp, -6 bp, WT	chimär	125-39	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-15	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot	125-40	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-16	+	+1 bp	homozygot	125-41	-	WT	homozygot
125-17	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot	125-42	+	+1 bp	homozygot
125-18	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-43	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-19	+	+ 1 bp, -24 bp, WT	chimär	125-44	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-20	+	-1 bp	homozygot	125-45	+	+1 bp	homozygot
125-21	-	WT	homozygot	125-46	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-22	+	+1 bp	homozygot	125-47	+	+1 bp	homozygot
125-23	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-48	+	+1 bp	homozygot
125-24	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-49	-	WT	homozygot
125-25	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-50	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär

Tab. A 7: Übersicht der PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten T₁ Individuen von T₀ Pflanze #126.

Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	Modifikation in bp	Zygotie	Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	Modifikation in bp	Zygotie
126-01	+	WT	homozygot	126-26	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-02	-	WT	homozygot	126-27	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
126-03	+	-1bp, WT	heterozygot/chimär	126-28	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-04	-	WT	homozygot	126-29	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-05	+	-1 bp	homozygot	126-30	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-06	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-31	-	WT	homozygot
126-07	-	WT	homozygot	126-32	+	-1 bp	homozygot
126-08	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot	126-33	+	+1 bp	homozygot
126-09	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-34	+	WT	homozygot
126-10	-	WT	homozygot	126-35	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-11	+	-1bp, WT	heterozygot/chimär	126-36	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-12	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-37	-	WT	homozygot
126-13	-	+ 1 bp	homozygot	126-38	+	-4 bp	homozygot
126-14	+	+1 bp, WT	heterozygot/chimär	126-39	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-15	+	+1 bp, WT	heterozygot/chimär	126-40	+	-3 bp, WT	heterozygot/chimär
126-16	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-41	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
126-17	+	WT	homozygot	126-42	-	>1 <i>gfp</i> Variante	hetero/chimär
126-18	-	WT	homozygot	126-43	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-19	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-44	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-20	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-45	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-21	+	+1 bp	homozygot	126-46	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
126-22	+	+1 bp	homozygot	126-47	-	WT	homozygot
126-23	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-48	+	+1 bp	homozygot
126-24	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot	126-49	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
126-25	+	+1 bp	homozygot	126-50	-	+1 bp	homozygot

Tab. A 8: Übersicht PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten T₁ Individuen von den T₀ Pflanzen #254 (linke Hälfte) und #258 (rechte Hälfte).

Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	PCR gRNA	Modifikation in bp	Zygotie	Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	PCR gRNA	Modifikation in bp	Zygotie
254-01	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	258-01	-	-	+1 bp	homozygot
254-02	-	-	WT	homozygot	258-02	-	-	WT	homozygot
254-03	+	+	-54 bp, -132 bp, WT	chimär	258-03	+	+	+1 bp, -51bp	heterozygot/chimär
254-04	-	-	WT	homozygot	258-04	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-05	-	-	WT	homozygot	258-05	+	+	+1 bp	homozygot
254-06	-	-	WT	homozygot	258-06	+	+	+1 bp, -13/+2 bp	heterozygot/chimär
254-07	+	+	-54 bp, -132 bp	heterozygot/chimär	258-07	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-08	+	+	-54 bp, -132 bp	heterozygot/chimär	258-08	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-09	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	258-09	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-10	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	258-10	+	+	+1 bp	homozygot
254-11	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	258-11	-	-	+1 bp, WT	heterozygot
254-12	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	258-12	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-13	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	258-13	-	-	+1 bp	homozygot
254-14	+	+	-54 bp, -132 bp	heterozygot/chimär	258-14	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-15	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	258-15	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär

Tab. A 9: Übersicht der PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten Regenerate aus der embryogenen Pollenkultur von T₀ Pflanze #125.

Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	Modifikation in bp	Zygotie	Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	Modifikation in bp	Zygotie
125-P01	+	-7 bp	homozygot	125-P32	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P02	+	-7 bp	homozygot	125-P33	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P03	+	-7 bp	homozygot	125-P34	+	+1 bp	homozygot
125-P04	+	-7 bp	homozygot	125-P35	+	-7 bp	homozygot
125-P05	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P36	+	-7 bp	homozygot
125-P06	+	-4 bp, WT	heterozygot/chimär	125-P37	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P07	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P38	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P08	+	-1 bp	homozygot	125-P39	+	-16 bp	homozygot
125-P09	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P40	+	+1 bp	homozygot
125-P10	+	-7 bp	homozygot	125-P41	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P11	+	-7 bp	homozygot	125-P42	+	-1 bp	homozygot
125-P12	+	-7 bp	homozygot	125-P43	+	+1 bp	homozygot
125-P13	+	+1 bp, -5 bp, -6/+1 bp	chimär	125-P44	+	-2/+2 bp	homozygot
125-P14	+	-1 bp, WT	heterozygot/chimär	125-P45	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P15	+	-1 bp	homozygot	125-P46	+	-7 bp	homozygot
125-P16	+	-1 bp	homozygot	125-P47	+	+1 bp	homozygot
125-P17	+	-7 bp	homozygot	125-P48	+	-4 bp	homozygot
125-P18	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P49	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P19	+	-7 bp	homozygot	125-P50	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P20	+	-1 bp	homozygot	125-P51	+	+1 bp	homozygot
125-P21	+	-7 bp	homozygot	125-P52	+	-9 bp	homozygot
125-P22	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P53	+	-21 bp	homozygot
125-P23	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P54	+	+1 bp	homozygot
125-P24	+	-1 bp	homozygot	125-P55	+	+1 bp	homozygot
125-P25	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P56	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P26	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P57	+	+1 bp	homozygot
125-P27	+	-7 bp	homozygot	125-P58	+	-2/+2	homozygot
125-P28	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P59	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-P29	+	-1 bp	homozygot	125-P60	+	-9 bp	homozygot
125-P30	+	-4 bp, WT	heterozygot/chimär	125-P61	+	-228 bp, WT	heterozygot/chimär
125-P31	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P62	+	+1 bp	homozygot

Tab. A 10: Übersicht der PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten somatischen Klone von T₀ Pflanze #125.

Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	PCR gRNA	Modifikation des <i>gfp</i> in bp	Zygotie
125-SC-01	+	+	-8 bp, -90/+2 bp, WT	chimär
125-SC-02	+	+	+1 bp	homozygot
125-SC-03	+	+	+1 bp	homozygot
125-SC-04	+	+	-3, -19, -51 bp, WT	chimär
125-SC-05	+	+	-7 bp, WT	heterozygot/chimär
125-SC-06	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-07	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-08	+	+	+1 bp, -1 bp, WT	chimär
125-SC-09	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-10	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-11	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-12	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-13	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-14	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-15	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär

Tab. A 11: Übersicht der PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten Nachkommen von den somatischen Klonen #125-SC-01, #125-SC-02, #125-SC-03 und #125-SC-05.

Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	PCR gRNA	Modifikation in bp	Zygotie	Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	PCR gRNA	Modifikation in bp	Zygotie
125-SC-01-01	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-SC-03-01	-	-	Kein <i>gfp</i> !	-
125-SC-01-02	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-SC-03-02	-	-	+1 bp	homozygot
125-SC-01-03	+	+	-1 bp	homozygot	125-SC-03-03	+	+	Kein <i>gfp</i> !	-
125-SC-01-04	+	+	-8 bp	homozygot	125-SC-03-04	+	+	+1 bp	homozygot
125-SC-01-05	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-SC-03-05	+	+	Kein <i>gfp</i> !	-
125-SC-01-06	-	-	-1 bp	homozygot	125-SC-03-06	+	+	+1 bp	homozygot
125-SC-01-07	+	+	-1 bp, -5 bp	heterozygot/chimär	125-SC-03-07	+	+	+1 bp	homozygot
125-SC-01-08	+	+	-8 bp	homozygot	125-SC-03-08	+	+	+1 bp	homozygot
125-SC-01-09	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-SC-03-09	+	+	+1 bp	homozygot
125-SC-01-10	+	+	-8 bp	homozygot	125-SC-03-10	+	+	Kein <i>gfp</i> !	-
125-SC-01-11	-	-	-8 bp, WT	heterozygot	125-SC-05-01	+	+	-1 bp, -7 bp	heterozygot/chimär
125-SC-01-12	-	-	-8 bp	homozygot	125-SC-05-02	+	+	-1 bp	homozygot
125-SC-01-13	+	+	WT	homozygot	125-SC-05-03	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-01-14	+	+	-8 bp	homozygot	125-SC-05-04	+	+	-1 bp, -7 bp	heterozygot/chimär
125-SC-01-15	+	+	-8 bp	homozygot	125-SC-05-05	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-02-01	-	-	+1 bp	homozygot	125-SC-05-06	-	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-SC-02-02	+	+	+1 bp	homozygot	125-SC-05-07	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-02-03	-	-	+1 bp	homozygot	125-SC-05-08	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-SC-02-04	+	+	+1 bp	homozygot	125-SC-05-09	+	+	-1 bp	homozygot
125-SC-02-05	+	+	+1 bp	homozygot	125-SC-05-10	+	+	-7 bp	homozygot
125-SC-02-06	-	-	+1 bp	homozygot					
125-SC-02-07	+	+	+1 bp	homozygot					
125-SC-02-08	+	+	+1 bp	homozygot					
125-SC-02-09	+	+	+1 bp	homozygot					
125-SC-02-10	+	+	+1 bp	homozygot					

Tab. A 12: Übersicht der PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten T₂ Nachkommen von T₀ Pflanze #125 und #126.

Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	PCR gRNA	Modifikation in bp	Zygotie	Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	PCR gRNA	Modifikation in bp	Zygotie
125-14-01	+	+	-3 bp	homozygot	126-05-01	-	-	WT	homozygot
125-14-02	x	x	x	x	126-05-02	-	-	WT	homozygot
125-14-03	+	+	-1/+1 bp	homozygot	126-05-03	-	-	WT	homozygot
125-14-04	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-05-04	+	+	-1 bp	homozygot
125-14-05	-	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot	126-05-05	+	+	-1 bp	homozygot
125-14-06	+	+	-3 bp	homozygot	126-40-01	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-14-07	+	+	-1 bp	homozygot	126-40-02	-	-	WT	homozygot
125-14-08	-	-	-3 bp	homozygot	126-40-03	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-14-09	+	+	-3 bp	homozygot	126-40-04	x	x	x	x
125-14-10	-	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot	126-40-05	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-14-11	+	+	-3 bp	homozygot	126-40-06	+	+	-3 bp	homozygot
125-14-12	+	+	-3 bp	homozygot	126-40-07	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-14-13	+	+	-3 bp	homozygot	126-40-08	-	-	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot
125-14-14	-	-	-1 bp, +77 bp	heterozygot	126-40-09	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-14-15	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-40-10	+	+	Kein <i>gfp</i> !	-
125-19-01	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-40-11	+	+	Kein <i>gfp</i> !	-
125-19-02	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-40-12	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-19-03	+	+	+1 bp, -24 bp	heterozygot/chimär	126-40-13	-	-	-2 bp, WT	heterozygot/chimär
125-19-04	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	126-40-14	+	+	-3 bp	homozygot
125-19-05	+	+	+1 bp	homozygot	126-40-15	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
125-19-06	+	+	+1 bp	homozygot					
125-19-07	+	+	+1 bp, -24 bp	heterozygot/chimär					
125-19-08	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär					
125-19-09	+	+	Kein <i>gfp</i> !	-					
125-19-10	+	+	+1 bp	homozygot					
125-19-11	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär					
125-19-12	+	+	+1 bp	homozygot					
125-19-13	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär					
125-19-14	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär					
125-19-15	+	+	+1 bp	homozygot					

Tab. A 13: Übersicht der PCR- und Sequenzierungsergebnisse der untersuchten T₂ Nachkommen der T₀ Pflanze #254 (linke Hälfte) und der Regenerate aus der embryogenen Pollenkultur #125-P58 und #125-P61 (rechte Hälfte).

Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	PCR gRNA	Modifikation in bp	Zygotie	Bezeichnung Pflanze	PCR Cas9	PCR gRNA	Modifikation in bp	Zygotie
254-08-01	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P58-01	+	+	-2/+2 bp	homozygot
254-08-02	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P58-02	+	+	-2/+2 bp	homozygot
254-08-03	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P58-03	+	+	-2/+2 bp	homozygot
254-08-04	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P58-04	+	+	-2/+2 bp	homozygot
254-08-05	+	+	-54 bp	homozygot	125-P58-05	+	+	-2/+2 bp	homozygot
254-08-06	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P61-01	x	x	x	x
254-08-07	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P61-02	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-08-08	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P61-03	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-08-09	+	+	-54 bp, -132 bp	heterozygot/chimär	125-P61-04	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-08-10	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P61-05	+	+	-228 bp	homozygot
254-08-11	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P61-06	+	+	-228 bp	homozygot
254-08-12	+	+	-54 bp	homozygot	125-P61-07	+	+	-228 bp	homozygot
254-08-13	+	+	-54 bp	homozygot	125-P61-08	+	+	-4 bp	homozygot
254-08-14	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P61-09	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
254-08-15	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär	125-P61-10	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
					125-P61-11	+	+	-4 bp	homozygot
					125-P61-12	+	+	-228 bp	homozygot
					125-P61-13	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär
					125-P61-14	+	+	-228 bp	homozygot
					125-P61-15	+	+	>1 <i>gfp</i> Variante	heterozygot/chimär

Tab. A 14: Übersicht der Ergebnisse von T7E1 Assay und Sequenzierungen (direkt und Einzelklone) von gRNA/Cas9 positiven primär transgenen Pflanzen.

Co-Transformation	Bezeichnung Pflanze	Transformations-experiment Nr.	Ergebnis T7E1 Assay	direkte Sequenzierung des PCR-Produkts	Modifikation in bp	Zygotie
NbH3-ts + <i>NbCENH3</i> -gRNA1	TP1/1L01	1	-	Doppelpeak	+1, -1, -18, -54 bp, WT	chimär
	TP1/1L10	2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
	TP1/1L47	2	+	/	+1 bp, WT	heterozygot/chimär
	TP1/1L48	2	+	/	+1 bp, -4 bp, WT	chimär
NbH3-ts + <i>NbCENH3</i> -gRNA2	TP1/2L87	3	+	/	-12 bp, WT	heterozygot/chimär
NbH3-ts + <i>NbCENH3</i> -gRNA3	TP1/3L11	2	-	Doppelpeak	-6 bp, WT	heterozygot/chimär
	TP1/3L41	1	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
	TP1/3L71	3	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
AtCENH3-ts + <i>NbCENH3</i> -gRNA1	TP1/4L41	1	-	Doppelpeak	+1 bp, WT	heterozygot/chimär
	TP1/4L43	1	-	Doppelpeak	+1 bp, WT	heterozygot/chimär
	TP1/4L44	2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
AtCENH3-ts + <i>NbCENH3</i> -gRNA2	TP1/5L06	2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
AtCENH3-ts + <i>NbCENH3</i> -gRNA3	TP1/6L13	2	-	Doppelpeak	-1/+1 bp, WT	heterozygot/chimär
	TP1/6L14	2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
	TP1/6L16	2	-	Doppelpeak	-1/+1 bp, WT	heterozygot/chimär
	TP1/6L21	1	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
	TP1/6L22	1	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
	TP1/6L23	1	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
	TP1/6L44	2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
	TP1/6L49	2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
	TP1/6L66	3	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
	<i>NbCENH3</i> -gRNA4	TP1/7L17	2	-	kein Doppelpeak	WT
TP1/7L18		2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
TP1/7L25		2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
TP1/7L32		2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
TP1/7L41		1	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
TP1/7L42		1	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
TP1/7L43		1	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
TP1/7L53		2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot
TP1/7L54		2	-	kein Doppelpeak	WT	homozygot

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Dr. Jochen Kumlehn für die Bereitstellung des interessanten und vielfältigen Themas sowie für die sehr guten Arbeitsmöglichkeiten und die zahlreichen Hinweise und Diskussionen bedanken.

Prof. Dr. Thomas Debener und Prof. Dr. Traud Winkelmann danke ich für die Übernahme der Tätigkeit als Referent bzw. Koreferentin meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Friedrich Fauser und Prof. Dr. Holger Puchta für die Bereitstellung des Gateway® kompatiblen gRNA/Cas9 Vektorsystems.

Ich danke Dr. Twan Rutten für die Unterstützung bei den Aufnahmen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und Lynne Main für die professionellen Aufnahmen der *cenh3* Mutanten.

Auch beim gesamten Gewächshausteam möchte ich mich für die Pflege meiner Pflanzen und eine gute Zusammenarbeit bedanken.

Maia Gurushidze, Götz Hensel und Stefan Hiekel sowie allen Kooperationspartnern danke ich für die praktische und theoretische Unterstützung und die anregenden Diskussionen, die mich bei der Bearbeitung meines Themas vorangebracht haben.

Im Besonderen möchte ich mich bei Andrea Müller und Petra Hoffmeister für ihre exzellente technische Hilfe bedanken.

Ich möchte mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie für die unendliche Hilfsbereitschaft und die tolle familiäre Atmosphäre innerhalb der Gruppe bedanken. Neben dem freundlichen Arbeitsklima werden mir natürlich auch unsere Gruppenausflüge und gemeinsamen Feierlichkeiten in guter Erinnerung bleiben.

Für die Abwechslungen zum Laboralltag durch gemeinsame Unternehmungen bedanke ich mich bei meinen „alten“ und „neuen“ Freunden. Unvergesslich werden besonders die diversen interkulturellen Ereignisse bleiben. Bei Stefanie Zschächner möchte ich mich außerdem für die Unterstützung beim Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die jahrelange Unterstützung und das Vertrauen, das sie mir immer entgegengebracht haben. Dankbar bin ich auch für den tollen Familienzusammenhalt und den sich daraus ergebenden unvergesslichen Momenten (an Land und zu Wasser).

Zuletzt möchte ich Alexandre für die bisherige, wunderschöne gemeinsame Zeit und die vielen Momente, in denen er mich zum Lachen brachte, danken. Auch seiner Familie danke ich für die liebevollen Augenblicke und den ein oder anderen „Französischkurs“.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sindy Schedel
Geburtsdatum: 11.12.1987
Geburtsort: Pößneck
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung/ wissenschaftlicher Werdegang

seit 05/2012 wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben
Arbeitsgruppe: Pflanzliche Reproduktionsbiologie

10/2010 – 03/2012 wissenschaftliche Hilfskraft an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Oelmüller

10/2006 – 03/2012 Biologie Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss: Diplombiologin (sehr gut)
Diplomarbeit mit dem Titel: „Die Rolle von HSPRO2 in der Interaktion zwischen *Piriformospora indica* und *Arabidopsis thaliana*“

08/1998 – 06/2006 Besuch des Orlatal-Gymnasiums in Neustadt an der Orla
Abitur (gut)

Auszeichnungen

Posterpreis (1. Platz) – “Uniparental genome elimination in tobacco via modification of the centromere-specific histone CENH3” – Plant Science Student Conference, Halle (Saale), 28.-31.05.2013

Travel Award – “Establishment of genome engineering in tobacco aiming to develop novel haploid technology” – Jahrestagung der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie, Gatersleben, 02.-04.05.2016

Sprachen

Deutsch (Muttersprache)
Englisch (fließend)
Französisch (Grundkenntnisse)