

**Funktionelle Analyse von TALEs in *Xanthomonas oryzae* und
Entwicklung von TALENs zum *Genome Editing***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

genehmigte Dissertation

von

Maik Reschke, M.Sc.

geboren am 03.07.1988 in Lutherstadt Eisleben

2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jens Boch

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Debener

Tag der Promotion: 14.09.2018

für meine Tochter

*„Erfolg ist ein Gesetz der Serie und Misserfolge sind
Zwischenergebnisse. Wer weitermacht, kann gar nicht verhindern, dass
er irgendwann auch Erfolg hat.“*

Thomas Alva Edison

(1847 - 1931), US-amerikanischer Erfinder, Entdecker des glühelektrischen Effekts

Zusammenfassung

Schlagworte: TALE, TALEN, *Xanthomonas*, Reis, *Genome Editing*

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) sind pflanzenpathogene Bakterien, die in einigen Reisanbaugebieten zu schweren Ernteeinbußen führen. TALEs sind Virulenzfaktoren aus *Xoo* und fungieren als Transkriptionsaktivatoren in pflanzlichen Zellen. Mit Hilfe von bis zu 20 TALEs pro Stamm, verändert *Xoo* die pflanzliche Genexpression zu seinen Gunsten. Jedoch sind nur für wenige TALEs induzierte Zielgene bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene *Xoo*-Stämme sequenziert und das TALE-Repertoire analysiert. Dabei wurden TALEs in Klassen eingeteilt und eine einheitliche Nomenklatur etabliert. Mit Hilfe einer RNA-seq-Analyse wurden neue potentielle Zielgene in Reis für 16 TALEs identifiziert. Dabei konnte das Gen *Os03g03034*, welches für eine Flavonol-Synthase kodiert, als potentielles Zielgen des TALEs TalAQ identifiziert werden. Durch die Induktion dieses Gens könnte *Xoo* pflanzliche Abwehrreaktionen unterdrücken. Um einer Infektion von *Xoo* entgegenzuwirken, ist es möglich die TALE-Bindestelle in Promotoren von Suszeptibilitätsgenen zu mutieren. Auf diese Weise können die TALEs nicht länger binden und rezessive Resistenzgene erstellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden TALE-Nukleasen (TALEN) erstellt, um die Bindestellen der natürlichen TALEs AvrXa7 und TalC zu mutieren. Somit konnte der Promotor eines der wichtigsten Suszeptibilitätsgene von Reis, *OsSWEET14*, durch unsere Kooperationspartner vom IRD und CIRAD in Montpellier, erfolgreich an zwei verschiedenen Stellen editiert werden. Drei der entstandenen Reislinien (sweet14-10, sweet14-11 und sweet14-32) wurden in dieser Arbeit, mit Hilfe von Inokulationsexperimenten, analysiert. Die durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass die Reislinien gegenüber Infektionen von *Xoo*-Stämmen mit den TALEs AvrXa7 bzw. TalC resistent sind. Somit konnten erfolgreich resistente Reispflanzen generiert werden.

TALEN funktionieren als Paar, wobei zwei TALEN-Proteine in einer *tail-to-tail*-Orientierung an die DNA binden. So können die *FokI*-Monomere dimerisieren und die DNA spalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden, zur Vereinfachung dieser Technologie, *single-chain* TALEN (scTALEN) erstellt. Dafür wurden an einen TALE zwei heterodimerisierende *FokI*-Monomere fusioniert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die scTALEN die DNA *in vitro* effizient spalten. Somit konnte eine neue Art benutzerdefinierbarer Restriktionsenzyme erstellt werden, welche es möglich machen, eine beliebige DNA-Sequenz an einer spezifischen Stelle mit einem definierten vier Basenpaar-Überhang zu spalten. Die Aktivität der scTALEN konnte *in vitro*, bisher jedoch nicht *in vivo*, detektiert werden. In Zukunft könnte diese Technik zum vereinfachten *Genome Editing* weiterentwickelt werden.

Summary

Keywords: TALE, TALEN, *Xanthomonas*, Reis, *Genome Editing*

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) are phytopathogenic bacteria causing severe crop losses in rice growing areas. TALEs are virulence factors from *Xoo*, which act as transcriptional activators in plant cells. Due to 20 TALEs per strain, *Xoo* is changing plant gene expression in its favor. Unfortunately, only a few TALE target genes are known. In this work, four different *Xoo* strains were sequenced and the TALE repertoire was analyzed. TALEs were divided into classes and a consistent nomenclature was established. Using RNAseq analysis, new potential target genes in rice were identified for 16 TALEs. The gene *Os03g03034*, which codes for a flavonol-synthase, could be identified as a potential target gene of the TALE TalAQ. By inducing this gene, *Xoo* could suppress plant defense reactions. To counteract infection of *Xoo*, it is possible to mutate the TALE binding site in promoters of susceptibility genes. Hence, the TALEs can no longer bind to its target and recessive resistance genes are created. In this work, TALE nucleases (TALEN) were constructed to mutate the binding sites of the natural TALEs AvrXa7 and TalC. Thus, the promoter of one of the most important susceptibility genes of rice, *OsSWEET14*, was successfully edited in two different loci, by our cooperation partners of the IRD and CIRAD in Montpellier. Three of the resulting rice lines (sweet14-10, sweet14-11, and sweet14-32) were analyzed using inoculation experiments. The experiments indicated that the rice lines are resistant to infections of *Xoo* strains with the TALEs AvrXa7 and TalC, respectively. Thereby, successfully resistant rice plants could be generated. TALEN function as a pair, with two TALEN proteins binding to the DNA in a tail-to-tail orientation. Hence, the FokI monomers can dimerize and cleave the DNA. As part of this work, to simplify this technology, single-chain TALEN (scTALEN) has been created. For this purpose, two heterodimerizing *FokI* monomers were fused to one TALE. It has been shown that the scTALEN efficiently cleave the DNA *in vitro*. This leads to a new kind of user-definable restriction enzymes could be created which make it possible to cleave any DNA sequence at a specific site with a defined four base pair overhang. The activity of scTALEN could be detected *in vitro*, but not yet *in vivo*. In the future, this technique could be further developed for simplified genome editing.

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen Menschen, die mich auf dem Weg zur Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei Frau Prof. Dr. Ulla Bonas möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufangen.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe der AG Bonas bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und ein angenehmes Laborklima. Außerdem möchte ich mich bei Carola, Marina und Bianca bedanken, ohne die ein zügiges und effektives Arbeiten nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin danke ich Dr. Jan Grau und Annett Erkes für die gute Zusammenarbeit bei allen bioinformatischen Themen.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jens Boch für die Möglichkeit, dieses spannende Thema zu bearbeiten, sowie für seine gute Betreuung und die anregenden Diskussionen.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe der Pflanzenbiotechnologie für die gute Aufnahme und Zusammenarbeit sowie das tolle Arbeitsklima. Vielen Dank auch an die TAs Yvonne, Beate und Sandra, die immer geholfen und alles im Labor gezeigt haben.

Annekatriin, Steffi, Jana und Sebastian danke ich besonders für die immer wieder anregenden und lustigen Diskussionen über wissenschaftliche und alltägliche Dinge.

Jana und Sebastian danke ich für die gemeinsame Zeit in Hannover.

Harti, Peter und Henne danke ich einfach für Alles. Von gemeinsamen Kaffeepausen, Diskussionen und Motivation bis hin zu gemeinsamen lustigen Abenden.

Besonderer Dank geht an meine Familie und Freunde für die Unterstützung während der gesamten Zeit.

Meiner Frau Sandra möchte ich für ihre Unterstützung und Geduld danken, besonders während der letzten Zeit dieser Arbeit.

Danke

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Interaktion von pflanzenpathogenen Bakterien und ihrem Wirt.....	1
1.2	<i>Xanthomonas</i> spp. – eine Gruppe phytopathogener Bakterien.....	3
1.3	TALEs – <i>transcription activator-like effectors</i>	5
1.3.1	Aufbau und Funktionsweise von TALEs.....	5
1.3.1.1	Der TALE-Code.....	6
1.3.1.2	Die Struktur von TALE- <i>repeats</i>	8
1.3.1.3	Verfeinerung und Ausnahmen des TALE-Codes.....	9
1.3.2	TALEs als Virulenzfaktoren.....	10
1.3.2.1	Bekannte Suszeptibilitätsgene von <i>Xoo</i> -TALEs.....	11
1.3.2.2	Weitere bekannte Ziel-Gene anderer <i>Xanthomonas</i> spp.....	13
1.3.3	TALE-abhängige Resistenzen.....	14
1.3.3.1	Rezessive Resistenzgene.....	14
1.3.3.2	Dominante Resistenzgene.....	15
1.3.4	TALEs als molekularbiologische Werkzeuge.....	16
1.3.4.1	Erstellung benutzerdefinierter künstlicher TALEs.....	16
1.3.4.2	TALEs zur Induktion und Repression der Genexpression in verschiedenen Organismen.....	18
1.4	<i>Genome Editing</i>	19
1.4.2	Zink-Finger-Nukleasen (ZFN)	20
1.4.3	TALE-Nukleasen (TALEN)	25
1.5	Zielstellung der Arbeit.....	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Material.....	29
2.1.1	Verwendete Plasmide.....	29
2.1.2	Verwendete Oligonukleotide.....	35
2.1.3	Verwendete Bakterienstämme.....	38
2.1.4	Verwendetes Pflanzenmaterial.....	38
2.1.5	Verwendetes Medien und deren Zusammensetzung.....	38
2.1.6	Verwendete Lösungen und Puffer.....	40
2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Plasmidpräparation.....	41
2.2.2	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	42
2.2.3	Mutagenese mittels SOE-PCR.....	42
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	43
2.2.5	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	43
2.2.6	Restriktionsanalysen.....	43
2.2.7	Gerichtete Ligation in pENTR/D-TOPO.....	43
2.2.8	Rekombinationsbasierte Klonierung mittels GATEWAY.....	44
2.2.9	Transformation elektrisch kompetenter Bakterienzellen.....	45
2.2.10	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	45
2.2.11	Erstellung von <i>Golden Gate</i> Modulen in pUC57.....	45
2.2.12	Erstellung artifizierlicher TAL-Effektoren bzw. TAL-Effektor-Nukleasen mit Hilfe der <i>Golden TAL Technology</i>	46
2.2.13	Sequenzierung von DNA.....	47
2.2.14	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	48

2.2.15	Aktivitätstest der TALENs – <i>in vitro cleavage assay</i>	48
2.2.16	Reportergenwiederherstellungsstudien.....	49
2.2.16.1	Quantitative Analyse der β -Glucuronidase Aktivität.....	49
2.2.16.2	Proteinbestimmung mittels Bradford Assay.....	50
2.2.16.3	Qualitative Analyse der β -Glucuronidase Aktivität.....	50
2.2.17	Analyse der subzellulären Lokalisation.....	50
2.2.18	Analyse der Expression von TAL-Effektor-Nukleasen.....	51
2.2.18.1	Aufarbeitung von Pflanzenmaterial.....	51
2.2.18.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	51
2.2.18.3	Nachweis von Proteinen mittels Coomassie Färbung.....	51
2.2.18.4	Immunoblot Analyse.....	51
2.2.19	Expression der TALENs <i>in vitro</i> mittels Transkriptions/Translations Kit.....	52
2.2.20	Inokulation von <i>Xoo</i> in Reis.....	52
2.2.21	Gen-Expressions-Analyse nach <i>Xoo</i> -Infektion.....	53
2.2.22	Gesamt-RNA-Isolierung aus pflanzlichem Gewebe.....	53
2.2.23	cDNA-Synthese.....	53
2.2.24	Quantitative Echtzeit PCR (<i>quantitative real time PCR</i> - qRT-PCR).....	53
2.2.25	Identifikation von potentiellen Zielgenen von <i>Xoo</i> TALEs mittels RNAseq-Analyse.....	54
2.2.26	Photometrische Messung des Salizylsäure-Level in Pflanzen.....	54
2.2.27	Erstellung des scFokI-Moduls.....	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Generierung Resistenter Reispflanzen mit Hilfe gerichteter Promotor- Mutation.....	55
3.1.1	Klonierung und Test von TALE-Nukleasen.....	55
3.1.2	Generierung resistenter Reispflanzen mit Hilfe von TALEN.....	57
3.1.3	Analyse ausgewählter resistenter Reislinien.....	59
3.2	Erstellung von <i>single-chain</i> TALEN.....	62
3.2.1	scTALEN schneiden DNA <i>in vitro</i>	64
3.2.2	Funktionalität der scTALEN <i>in vivo</i>	67
3.3	Identifizierung neuer Zielgene von <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> TALEs.....	74
3.3.1	Vorhersage potentieller Zielgene von <i>Xanthomonas</i> TALEs mit Hilfe von TALgetter.....	74
3.3.1.1	Test der Funktionsweise von TALgetter.....	75
3.3.2	Entschlüsselung des TALE Repertoires von <i>Xoo</i> mittels PacBio- Sequenzierung.....	76
3.3.3	Analyse von <i>Xanthomonas</i> -Genomen mit Hilfe von AnnoTALE.....	77
3.3.3.1	Identifizierung und Analyse von TALE-Genen.....	78
3.3.3.2	Erstellung von TALE-Klassen mit bekannten TALEs.....	78
3.3.3.3	Eine universelle Nomenklatur für TALEs.....	80
3.3.3.4	Klassifikation der TALEs von PXO83, PXO142 und ICMP3125.....	81
3.3.3.5	Vorhersage potentieller Ziele der TALE-Klassen oder einzelner TALEs mit AnnoTALE.....	82
3.3.3.6	Einteilung der TALEs in genomische TALE-Cluster.....	82
3.3.4	Vergleich der TALE-Repertoires verschiedener <i>Xoo</i> -Stämme.....	84
3.3.5	Suche nach TALE-Zielen in Reis mittels RNAseq-Analyse.....	86
3.3.5.1	Analyse der RNAseq-Daten.....	89
3.3.5.2	Erstellung einer Kandidatenliste durch Vergabe eines Zielgen-scores.....	91
3.3.5.3	Identifizierung und Test von potentiellen Zielgenen.....	91
3.3.5.4	Validierung von potentiellen Zielgenen von TALEs.....	95

4	Diskussion.....	99
4.1	Generierung resistenter Reispflanzen mit Hilfe von TALEN.....	99
4.1.1	Analyse der editierten <i>Kitaake</i> -Linien.....	99
4.1.2	Resistenter Reis mit Hilfe von dominanten Resistenzgenen.....	101
4.1.2.1	Nutzung von natürlich vorkommenden dominanten Resistenzgenen.....	101
4.1.2.2	Nutzung von dominanten Resistenzgenen mit Super-Promotoren.....	103
4.1.3	Resistenter Reis mit Hilfe neuer <i>Genome Editing</i> Werkzeuge.....	103
4.1.3.1	<i>Genome Editing</i> mit Hilfe von CRISPR/Cas9 in Reis.....	104
4.1.3.2	<i>Genome Editing</i> mit Hilfe von CRISPR/Cpf1.....	107
4.2	Konstruktion und Funktionalität von scTALEN.....	108
4.2.1	Aktivität von scTALEN <i>in vitro</i>	109
4.2.2	Aktivität von scTALEN <i>in vivo</i>	111
4.2.2.1	Kombination von zwei scTALEN.....	112
4.2.3	Aktivität von scFokI-Konstrukten in anderen Systemen.....	116
4.2.4	Alternative Systeme zu scTALEN für <i>Genome Editing</i>	117
4.3	Suche und Identifizierung neuer Ziel-Gene von Xoo TALEs.....	121
4.3.1	Analyse von Xoo-Genomen.....	122
4.3.2	Identifikation neuer TALE Zielgene.....	125
4.3.2.1	Das Zielgen <i>Os03g03034</i> der TalAQ-Klasse.....	126
4.3.2.2	Das Zielgen <i>Os06g29790</i> der TalAO-Klasse.....	130
4.3.3	Multiresistente Reispflanzen.....	133
	Literaturverzeichnis	135
	Anhang	158
	Lebenslauf	163
	Publikationen	164

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2.1	Funktion, Aufbau und Struktur von <i>Xanthomonas</i> TALEs.....	4
Abbildung 1.3.1	TALEs und ihre Ziel- und Resistenzgene.....	13
Abbildung 1.4.1	Übersicht über die Möglichkeiten des <i>Genome Editing</i> mit zielgerichteten Nukleasen.....	22
Abbildung 1.4.2	Design von ZFN und Dimerisierung von <i>FokI</i> -Varianten.....	24
Abbildung 1.4.3	Schema von TALEN gebunden an DNA.....	26
Abbildung 3.1.1	Position und Aufbau der verwendeten TALE-Nukleasen.....	56
Abbildung 3.1.2	Flussdiagramm zur Generierung resistenter Reispflanzen.....	58
Abbildung 3.1.3	Analyse der resistenten Reispflanzen.....	61
Abbildung 3.2.1	Analyse der Aktivität von scTALEN mit verschiedenen Linker-Längen mittels <i>in vitro cleavage</i> Assay.....	63
Abbildung 3.2.2	Vergleich der Aktivitäten von scTALEN und TALEN Paar mittels <i>in vitro cleavage</i> Assay.....	65
Abbildung 3.2.3	Analyse der Aktivität der scTALEN in Abhängigkeit einer Prä-Inkubation und Einfluss der Menge an eingesetzter DNA auf die Aktivität von scTALEN <i>in vitro</i>	66
Abbildung 3.2.4	Analyse der Aktivität Schnittpunkte von scTALEN <i>in vitro</i>	67
Abbildung 3.2.5	Analyse der Aktivität von scTALEN <i>in vivo</i> mit Hilfe eines GUS-Rekonstitutions-Assays.....	70
Abbildung 3.2.6	scTALEN-Aktivität im GUS-Rekonstitutions-Assay.....	72
Abbildung 3.2.7	Analyse der Fähigkeit von scTALEN genomische Deletionen zu erzeugen mit Hilfe eines AFLP Assays.....	73
Abbildung 3.3.1.1	Erkennung von vorhergesagten Zielsequenzen durch den TALE AvrXa10.....	76
Abbildung 3.3.3.2	Workflow von AnnoTALE.....	79
Abbildung 3.3.3.5	Verteilung der TALE-Gene in <i>Xoo</i> -Stämmen ICMP3125, PXO142, PXO83, PXO99, MAFF311018 und KACC10331.....	83
Abbildung 3.3.5.1	Schema der Probenbehandlung des RNAseq-Experiments.....	88
Abbildung 3.3.5.2	qRT-PCR-Analyse zum Test der einzelnen Proben für ein Replikat.....	90
Abbildung 3.3.5.3	Validierung ausgesuchter potentieller Zielgene von TalAO, TalAQ und TalAB.....	97
Abbildung 3.3.5.4	Nachweis der nachgebauten TALEs in dem <i>Xoo</i> -Stamm Roth1-8r.....	98
Abbildung 4.1.3	Funktion und Aufbau von CRISPR-Systemen.....	105
Abbildung 4.2.1	Test der Expression von scTALEN in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten.....	112
Abbildung 4.2.2	Schematische Darstellung des Ergebnisses von zwei DSBs....	113
Abbildung 4.2.3	Mögliche Erklärungen der scTALEN Aktivität.....	115
Abbildung 4.3.1	Evolution von TALEs des Clusters II.....	124
Abbildung 4.3.2.1.1	Genstruktur und Einteilung von <i>Os03g03034</i>	127
Abbildung 4.3.2.1.2	Modell der möglichen Funktionsweise von TalAQ im Virulenzprozess von <i>Xoo</i>	128
Abbildung 4.3.2.1.3	Photometrische Bestimmung der SA-Level in Reispflanzen.....	130
Abbildung 4.3.2.2	Modell der Funktion von TalAO bei der Virulenz von <i>Xoo</i>	132
Abbildung 5.1	Lage der entworfenen sgRNA-AP und -AQ.....	158
Abbildung 5.2	Lage der entworfenen sgRNA-2g1 und -BX.....	159
Abbildung 5.3	Lage der entworfenen sgRNA-Ax7 und -TC.....	160
Abbildung 5.4	Lage der entworfenen sgRNA-BM und -AR.....	161

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Verwendete Plasmide.....	29
Tabelle 2.2	Verwendete Oligonukleotide.....	35
Tabelle 2.3	Verwendete Bakterienstämme.....	38
Tabelle 2.4	Verwendete Medien und deren Zusammensetzung.....	38
Tabelle 2.5	Verwendete Antibiotika.....	39
Tabelle 2.6	Verwendete Lösungen/Puffer und deren Zusammensetzung.....	40
Tabelle 3.1.2	Zusammenfassung der Ergebnisse der Reis-Transformation zur Mutation der Avrxa7- und TalC-Box in <i>O. sativa</i> cv. Kitaake.....	59
Tabelle 3.3.1.1	Liste der sieben Gene, welche für AvrXa10 vorhergesagt wurden und in einem Microarray-Experiment mit PXO86 hochreguliert sind.....	75
Tabelle. 3.3.2	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> Stämme, welche in dieser Arbeit verwendet wurden und genomische Parameter der PacBio-Sequenzierung.....	77
Tabelle 3.3.3.6	Definition der TALE-Cluster.....	85
Tabelle 3.3.4	Vergleich der TALE-Repertoires von 15 verschiedenen <i>Xoo</i> -Stämmen.....	87
Tabelle 3.3.5.2	Potentielle Zielgene mit einem <i>score</i> von mindestens 4, identifiziert mit Hilfe der RNAseq-Analyse.....	92
Tabelle 3.3.5.3	Top-Kandidaten-Liste der potentiellen Zielgene für <i>Xoo</i> -TALEs.....	96
Tabelle 3.3.5.4	Übersicht über die nachgebauten TALEs.....	97
Tabelle 4.2.4.1	Vergleich der TALEN-, CRISPR/Cas9- und CRISPR/Cpf1-Systeme.....	119
Tabelle 4.2.4.2	Ablauf und Dauer der Klonierung von TALEN-, CRISPR/Cas9- bzw. CRISPR/Cpf1-Konstrukten.....	120
Tabelle 4.3.3	Übersicht über designte sgRNAs zur Generierung resistenter Reispflanzen.....	134
Tabelle 5.1	Übersicht über die erstellten Hexa- <i>repeat</i> -Module für die artifiziellen TALEs in Kapitel 3.3.5.4.....	162

Abkürzungsverzeichnis

A Adenin (Nukleotid)
A Alanin (Aminosäure)
Abb. Abbildung
AD Aktivierungsdomäne
Avr Avirulenz
bp Basenpaare
bzw. beziehungsweise
cDNA *complementary DNA*, komplementäre DNA
C Cytosin
Cas *CRISPR associated proteins*
Cpf1 *CRISPR from Prevotella and Francisella 1*
crRNA *CRISPR RNA*
CRISPR *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
D Aspartat, Asparaginsäure (Aminosäure)
DNA *deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
DSB *double strand break*, Doppelstrangbruch
ev empty vector, Leervektor
FMO Flavin-abhängige Monooxygenase
G Glycin (Aminosäure)
G Guanin (Nukleotid)
GFP *green fluorescent protein*, grün-fluoreszierendes Protein
GUS β -Glucuronidase
H Histidin (Aminosäure)
HDR *homology-directed repair*, homologe Reparatur
HR hypersensitive Reaktion
I Isoleucin (Aminosäure)
K Lysin (Aminosäure)
kb Kilobasen
kDa kilo Dalton
LRR *leucine rich repeat*
mRNA *messenger RNA*
MU Methylumbelliferon
MUG Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
N Asparagin (Aminosäure)
N beliebiges Nukleotid
NHEJ *non-homologous end joining*
NLS *nuclear localisation signal*, Kernlokalisierungssignal
OD optische Dichte
P Prolin (Aminosäure)
pv. Pathovar
PAMP *pathogen associated molecular pattern*
PCR *polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR *quantitative reverse transcription-PCR*
R-Gen Resistenzgen
RNA *ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
RVD *repeat variable diresidue*
S Serin (Aminosäure)
sgRNA *single guide RNA*
spp. *species pluralis*, Spezies

T Threonin (Aminosäure)
T Thymin (Nukleotid)
T3S Typ-III-Sekretionssystem
TSS *transcription start site*, Transkriptionsstartposition
TALE *transcription activator-like effector*
TALEN *transcription activator-like effector nuclease*
UPA *upregulated by Avrbs3*
UTR untranslatierte Region
Xcv Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*
Xoc Xanthomonas oryzae pv. *oryzicola*
Xoo Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*
z.B. zum Beispiel

1. Einleitung

Mit dem Aufkommen der Sesshaftigkeit und des Ackerbaus vor ca. 13.000-15.000 Jahren wurden vermehrt Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen angebaut. Somit kann diese Zeit auch als Anfang der Pflanzenzüchtung betrachtet werden. Damit einhergehend stieg jedoch die Bedrohung für den Menschen durch Pflanzenkrankheiten. Durch die zunehmende Züchtung der Kulturpflanzen auf Geschmack, Lebensmittelqualität und Ertrag, sowie deren Anbau in homogenen Kulturen, stieg auch die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen. Als Pathogene werden Stoffe oder Organismen bezeichnet, welche einem Lebewesen Schaden zufügen. Dies können zum Beispiel Mikroorganismen wie Pilze oder Bakterien sein.

Noch bis Mitte des 19. Jahrhunderts herrschte allgemein die Meinung, dass überirdische Kräfte („Urzeugung“) oder eine krankhafte Konstitution der Kulturpflanzen Krankheiten verursachen würden (Wilhelm & Tietz, 1978). Dies änderte sich als 1858 Julius Kühn sein Buch „Die Krankheiten der Kulturgewächse, ihre Ursachen und ihre Verhütung“ veröffentlichte. Dies war das erste spezielle Lehrbuch für Pflanzenkrankheiten. Julius Kühn beschrieb darin, durch genaue Beobachtung und durchgeführte Versuche, dass Krankheiten der Kulturpflanzen durch unabhängige Schaderreger wie Pilze oder Nematoden verursacht werden (Kühn, 1858). Dies war der Startschuss der modernen Phytopathologie und legte die Basis für das Studium der Pflanze-Schaderreger (Pathogen)-Interaktion.

1.1 Interaktion von pflanzenpathogenen Bakterien und ihrem Wirt

Eine der ersten wissenschaftlichen Beschreibungen von Bakterien als Auslöser von Pflanzenkrankheiten wurde 1878 von Thomas J. Burrill gemacht. Er identifizierte *Erwinia amylovora* als Erreger des Feuerbrands (Burrill, 1878, 1881). Feuerbrand ist eine Krankheit von Kernobstgewächsen. Die Symptome reichen bei befallenen Bäumen vom schwarz werden von Blüten, Blättern und Zweigen bis hin zum Absterben des ganzen Baumes und führen somit zu Ernteverlusten. Seitdem ist bekannt, dass nicht nur Menschen und Tiere, sondern auch Pflanzen ständig pathogenen Bakterien ausgesetzt sind.

Diese Bakterien befallen die Wirtspflanzen und manipulieren sie zu ihrem Vorteil, sodass eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, Vermehrung und Ausbreitung möglich ist. Doch ebenso wie Menschen und Tiere haben Pflanzen Abwehrmechanismen entwickelt, um eine Besiedlung von Bakterien und anderen Pathogenen zu verhindern. Sie können sich damit gegen die meisten Infektionsversuche erfolgreich verteidigen.

Das „pflanzliche Immunsystem“ besteht aus zwei Stufen. Die erste Stufe bilden präformierte Barrieren, zum Beispiel die Kutikula oder Haare auf der Blattoberfläche, sowie konstitutive Pflanzenabwehrstoffe, wie Enzyminhibitoren oder andere antimikrobielle Substanzen (Heath, 2000; Hückelhoven, 2007; Senthil-Kumar & Mysore, 2013). Überwindet ein Erreger die präformierten Barrieren und Abwehrstoffe trifft er auf die zweite Stufe des „pflanzlichen Immunsystems“. Diese ist im Gegensatz zum tierischen Immunsystem nicht zentral organisiert und durch spezielle Abwehrzellen gekennzeichnet (Nürnberger *et al.*, 2004). Bei der „pflanzlichen Immunantwort“ reagiert jede einzelne Pflanzenzelle auf das Eindringen von außen. Diese Antwort ist wiederum in zwei Bereiche aufgeteilt: einen „äußeren Radar“ auf der Zelloberfläche und einen „inneren Radar“ im Zellinneren (Nürnberger *et al.*, 2004; Jones & Dangl, 2006).

Den „äußeren Radar“ bezeichnet man als PTI (**PAMP triggered immunity**). Bei der PTI werden bestimmte bakterielle Strukturen, PAMPs (**pathogen associated molecular patterns**), durch spezielle Oberflächenrezeptoren, die PRRs (**pattern recognition receptors**), erkannt (Nürnberger *et al.*, 2004). PAMPs sind hochkonservierte Komponenten, die nur in Pathogenen vorkommen. Bekannte PAMPs sind zum Beispiel Chitin aus Pilzzellwänden oder Bestandteile des bakteriellen Flagellins (flg22). PRRs bestehen in der Regel aus einer extrazellulären Leucin-reichen „Antenne“ (LRR (**leucine rich repeat**)-Domäne) sowie einer Transmembran- und einer intrazellulären Kinase-Domäne. Nach der Erkennung von einem PAMP bildet der PRR einen Komplex mit anderen Kinasen, löst eine Signalkaskade aus und induziert somit eine Abwehrreaktion (Nürnberger *et al.*, 2004; Senthil-Kumar & Mysore, 2013). Folgen dieser so induzierten Abwehrreaktion können das Schließen der Spaltöffnungen sein oder die Verstärkung der Zellwände, durch Einlagerung von Callose zwischen die Zellwand und Plasmamembran. Somit werden die Pathogene, wie Bakterien und Pilze verlangsamt, so dass diese nicht weiter vordringen können (Jones & Dangl, 2006; Boller & He, 2009; Dodds & Rathjen, 2010; Senthil-Kumar & Mysore, 2013). Spezialisierte pathogene Bakterien haben Wege entwickelt, um die PTI der Pflanzen zu umgehen. Dafür schleusen sie bakterielle Virulenzfaktoren in die Pflanzenzelle ein. Die meisten gramnegativen Bakterien benutzen dafür ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), welches sogenannte Typ-III-Effektorproteine direkt in das Zytosol der pflanzlichen Zellen transloziert (Büttner & Bonas, 2002). Mit Hilfe der Typ-III-Effektorproteine, manipulieren die pathogenen Bakterien verschiedenste Abläufe in den Pflanzenzellen und können so unter anderem die PTI unterdrücken (Alfano & Collmer, 2004). Somit ist die Pflanze wieder suszeptibel und kann von den Bakterien besiedelt werden.

Nun kommt der „innere Radar“ der pflanzlichen Abwehr zum Einsatz, die sogenannte ETI (**effector triggered immunity**). Die ETI basiert auf der Überwachung wichtiger

intrazellulärer Komponenten und registriert Veränderungen durch eindringende Effektoren (Jones & Dangl, 2006). Typ-III-Effektoren, welche durch pflanzliche Resistenz-Gene (*R*-Gene) oder deren Produkte (*R*-Proteine) erkannt werden, bezeichnete man ursprünglich als Avirulenz-Proteine (*Avr*-Proteine). Diese Erkennung erfolgt auf Basis der Struktur eines Effektorproteins oder durch Kontrolle eines Effektor-Interaktionspartners (*Guard* Hypothese). Durch die Erkennung der bakteriellen Effektoren wird eine Signalkaskade ausgelöst und eine Abwehrreaktion induziert (Van Der Biezen & Jones, 1998; Jones & Dangl, 2006; Block *et al.*, 2008). Diese resultiert in den meisten Fällen in einem lokal begrenzten, programmierten Zelltod, welcher als hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet wird. Durch das Absterben der Zellen am Infektionsort werden den Pathogenen Wasser und Nährstoffe entzogen und somit die weitere Ausbreitung der Pathogene eingegrenzt bzw. verhindert. Die HR wird äußerlich als schwarzer Fleck (Nekrose) sichtbar. Um die angrenzenden Zellen zu schützen, werden bei einer HR Signale weitergegeben, die zur Verdickung der Zellwände durch Callose-Einlagerungen führen (Jones & Dangl, 2006; Boller & He, 2009; Dodds & Rathjen, 2010; Senthil-Kumar & Mysore, 2013). Weiterhin kann nach einer Infektion auch an den nicht befallenen Stellen der Pflanze eine erhöhte Resistenz entstehen. Dafür setzen die infizierten Zellen Signalstoffe, wie zum Beispiel Jasmonsäure, Ethylen und Salicylsäure frei (Gaffney *et al.*, 1993). Diese Signalstoffe verbreiten sich über das Phloem in der Pflanze und „warnen“ entfernt liegende Pflanzenbereiche. Von diesen Zellen werden dann vermehrt antimikrobielle Stoffe gebildet. Dies bezeichnet man als systemisch erworbene Resistenz (SAR – *systemic acquired resistance*; (Raskin, 1992; Gaffney *et al.*, 1993). Doch im evolutionären Wettlauf mit den Pflanzen konnten sich die Bakterien weiter anpassen. Sie konnten Effektoren mutieren oder verlieren, um die Erkennung durch die Pflanze zu verhindern. Weiterhin konnten sie neue Typ-III-Effektoren entwickeln, um bestimmten Prozessen der ETI entgegenzuwirken und die Pflanzen weiter zu infizieren. Diese gegenseitigen Anpassungen in der Pathogen-Pflanze-Interaktion werden als Zick-Zack-Modell beschrieben (Jones & Dangl, 2006).

1.2 *Xanthomonas* spp. – eine Gruppe phytopathogener Bakterien

Die Pflanzenpathogene der Gattung *Xanthomonas* sind eine heterogene Gruppe gramnegativer, stäbchenförmiger γ -Proteobakterien. Sie bilden eine Hülle aus dem Exopolysaccharid Xanthan, welches die Bakterien durch den Farbstoff Xanthin gelblich erscheinen lässt (Becker *et al.*, 1998). *Xanthomonas* spp. befallen zusammen über 400 Pflanzenfamilien, unter denen wichtige Kulturpflanzen wie Kohl, Baumwolle, Maniok, Zitruspflanzen, Reis und weitere Getreidearten zu finden sind (Leyns *et al.*, 1984; Mansfield *et al.*, 2012). Aufgrund ihres Wirtsspektrums werden sie in Pathovare (pv.)

eingeteilt. Beispiele hierfür sind die Reispathogene *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) und *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). Beide *Xanthomonas*-Stämme sind Erreger von verschiedenen Krankheiten von Reis (Niño-Liu *et al.*, 2006). Um Pflanzen zu befallen, dringen *Xanthomonas* spp. über natürliche Öffnungen wie Wunden, Stomata oder Hydathoden in die Pflanzen ein (Hayward, 1993; Lu *et al.*, 2008). Dort besiedeln sie, beispielsweise die Vaskulargefäße oder die Interzellularräume der Pflanze.

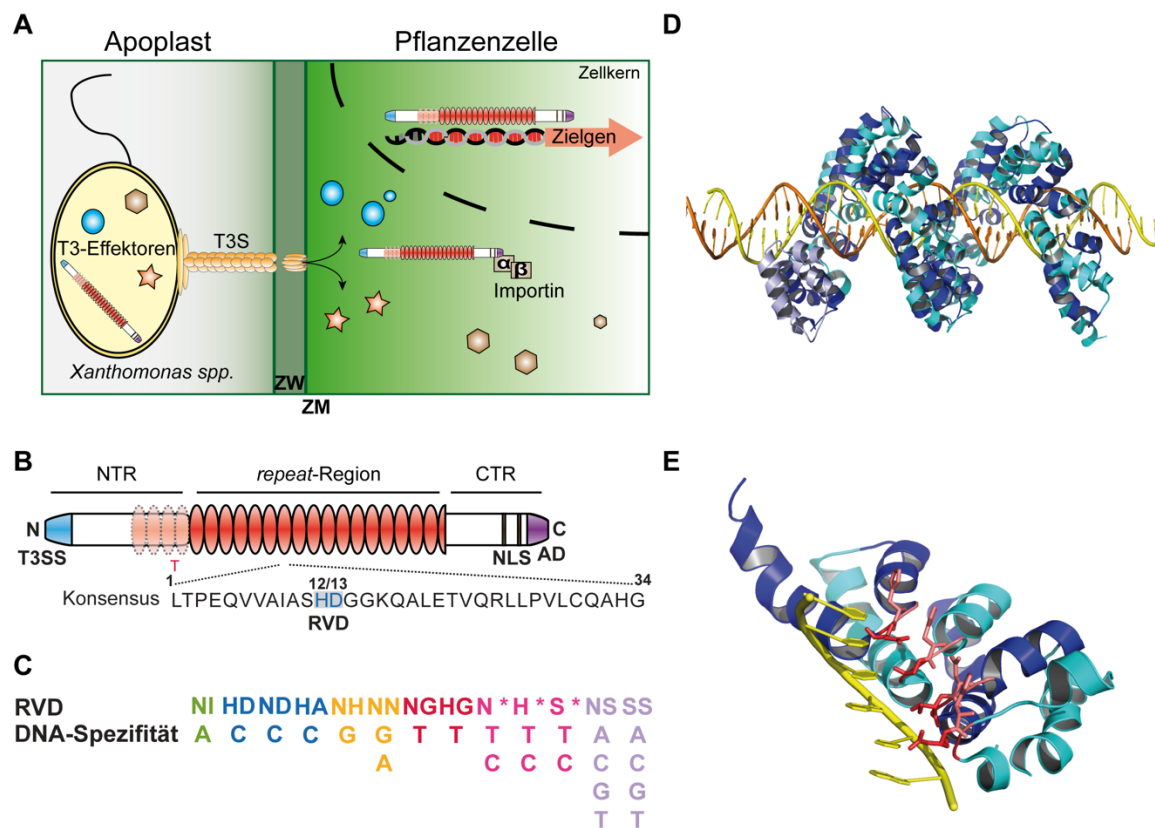


Abbildung 1.2.1 Funktion, Aufbau und Struktur von *Xanthomonas* TALEs

A) Phytopathogene Bakterien der Gattung *Xanthomonas* translozieren mit Hilfe eines Typ-III-Sekretionssystems (T3S) einen Cocktail verschiedener Typ-III-Effektorproteine in die pflanzliche Wirtszelle. Dort erfüllen die Effektoren unterschiedliche Aufgaben. TAL-Effektoren interagieren im Zytoplasma der Zelle mit Importin α , welches dann zusammen mit Importin β , den TALE in den pflanzlichen Zellkern transportiert. Im Zellkern binden TALEs an spezifische Sequenzen in Promotoren von Genen und induzieren deren Expression. **B)** Typischer Aufbau eines TAL-Effektors. Die N-terminale Region (NTR) enthält das für die Translokation wichtige Typ-III-Sekretions- und Translokationssignal (T3SS). Weiterhin finden sich in der NTR vier degenerierte *repeats*, wobei die *repeats* -1 und 0 für die Koordination des initialen Thymins verantwortlich sind. Die C-terminale Region (CTR) enthält zwei funktionale Kernlokalisierungssequenzen (NLS) und eine saure Aktivierungsdomäne (AD). Die zentrale *repeat*-Region eines TALEs besteht aus einer variierenden Anzahl eines meist 34 Aminosäure umfassenden Motivs (*repeat*). Die Aminosäuresequenz eines *repeats* ist hoch konserviert und variiert hauptsächlich an den Positionen 12 und 13. Deshalb werden diese Positionen auch *repeat variable diresidue* (RVD) genannt. **C)** Übersicht über die bekannten RVD-Spezifitäten. Die RVDs bestimmen welche Nukleotide in der Ziel-DNA-Sequenz gebunden werden. **D)** Röntgenkristallstruktur von dem DNA-gebundenem TALE Pthx1 (helllila: NTR, hellblau/dunkelblau: *repeat*-Region, orange/gelb: doppelsträngige DNA; Abb. modifiziert nach Mak *et al.* 2012). **E)** Detailliertere Ansicht der Interaktion zwischen der 13. AS eines *repeats* (rot) und der korrespondierenden DNA-Base (gelb). Zur Vereinfachung sind nur 6 *repeats* und der *sense*-Strang der DNA-Doppelhelix dargestellt (hellblau/dunkelblau: *repeat*-Region, hellrot: 12. AS eines TALE-*repeats*, dunkelrot: 13. AS eines TALE-*repeats*, gelb: *sense*-Strang der DNA). T3-Effektoren – Typ-III-Effektoren; T3S – Typ-III-Sekretionssystem; ZW – Zellwand; ZM – Zellmembran; NTR – N-Terminale Region; CTR – C-Terminale Region; T3SS – Typ-III-Sekretionssignal; NLS – nuclear localisation signal; AD – Aktivierungsdomäne; RVD – *repeat variable diresidue*.

1.3 TALEs – *transcription activator-like effectors*

Zur erfolgreichen Infektion von Wirtspflanzen manipulieren die Bakterien der Gattung *Xanthomonas* die Zellen ihrer Wirtspflanzen. Dafür nutzen sie ca. 20 – 40 verschiedene Typ-III-Effektorproteine, welche nach der Translokation in das Zellinnere in verschiedene zelluläre Abläufe eingreifen (Thieme *et al.*, 2005; Boch & Bonas, 2010). Eine besondere Rolle spielt dabei die Familie der *transcription activator-like effectors*, kurz TALEs. TALEs fungieren dabei als Transkriptionsaktivatoren und induzieren die Expression pflanzlicher Gene (Yang *et al.*, 2006). TALE-Gene kommen in verschiedensten *Xanthomonas*-Stämmen vor. Dabei variiert ihre Anzahl von 0 bis zu über 20 verschiedenen TALE-Genen pro Stamm (Scholze & Boch, 2011; Schornack *et al.*, 2013). Vertreter der Reis-Pathogene *Xoo* und *Xoc* weisen dabei die meisten TALE-Gene pro Stamm auf. Der erste TAL-Effektor, welcher beschrieben wurde, war AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*). Er wurde aufgrund seiner Erkennung durch das R-Gen *Bs3*, in resistenten Paprikapflanzen, entdeckt (Bonas *et al.*, 1989). Im Laufe der Zeit sind über 100 verschiedene TAL-Effektoren identifiziert worden, zum Beispiel PthA aus *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), AvrB6 aus *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*), AvrXa7 und PthXo1 aus *Xoo*. Anhand dieser Vertreter konnte gezeigt werden, dass manche TALEs eine erhebliche Rolle in der Virulenz des jeweiligen Stammes spielen (Swarup *et al.*, 1991; Bai *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010). Jedoch konnten bisher von den über 100 identifizierten TALEs, nur für wenige pflanzliche Ziel-Gene beschrieben werden (Boch & Bonas, 2010). Dies lässt vermuten, dass nicht alle TALEs einen großen Einfluss auf die Virulenz des jeweiligen Stammes haben. Daher kann das Studium und die Analyse weiterer *Xanthomonas*-Stämme und deren TALE-Repertoires sowie der einzelnen TALEs dazu beitragen, neue pflanzliche Ziel-Gene zu identifizieren sowie den Einfluss einzelner TALEs auf die Virulenz eines *Xanthomonas*-Stammes genauer zu beschreiben.

1.3.1 Aufbau und Funktionsweise von TALEs

TALEs sind in mehrerer Hinsicht besondere Proteine. Als erstes sind sie bakterielle Proteine, welche in Pflanzen als Transkriptionsaktivatoren wirken. Sie kommen, bis auf ein paar wenige verwandte Proteine in den pflanzenpathogenen *Ralstonia solanacearum* und *Burkholderia rhizoxinica*, nur in der Gattung *Xanthomonas* vor. TALEs zeigen untereinander eine sehr hohe Konservierung von 80 – 97% (Schornack *et al.*, 2006).

TALEs können in drei funktionelle Bereiche gegliedert werden, mit Hilfe derer sie ihre Funktion als Transkriptionsaktivatoren erfüllen. Diese drei Bereiche sind die N-terminale Region, die zentrale *repeat*-Region und die C-terminale Region (Abb. 1.2.1).

Die N-terminale Region (NTR) umfasst ca. 283 – 290 Aminosäuren (AS). Sie beinhaltet das Typ-III-Sekretions- und Translokationssignal, welches für die Translokation des TALEs in die pflanzliche Zelle sorgt (Szurek *et al.*, 2002; Boch & Bonas, 2010; Abb. 1.2.1A). Die C-terminale Region umfasst ca. 274 – 297 Aminosäuren. In ihr befinden sich zwei funktionale Kernlokalisierungssignale (NLS – *nuclear localisation signal*) sowie eine saure Aktivierungsdomäne (AD; Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000; Boch & Bonas, 2010; Abb. 1.2.1B). Mit Hilfe der NLSs interagieren TALEs mit der pflanzlichen Kern-Import-Maschinerie und werden so in den Zellkern transportiert. Die Deletion der NLSs führt zum Verlust der Kernlokalisierung und damit zum Verlust der Aktivität des TALEs (Zhu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000; Szurek *et al.*, 2001). Der dritte funktionale Bereich ist die zentrale *repeat*-Region. Sie vermittelt die spezifische Bindung der TALEs an eine bestimmte DNA-Sequenz im Promotor von pflanzlichen Genen. Die *repeat*-Region besteht aus 1,5 – 33,5 Wiederholungen eines meist 34 Aminosäuren umfassenden Motivs (*repeat*). Vergleicht man die Aminosäuresequenz der *repeats* untereinander fällt auf, dass diese hoch konserviert sind (Boch & Bonas, 2010).

Einige Positionen (G14 und L29) sind nahezu invariant, andere sind variabel (Position 4 und 32) und die Aminosäuren an Position 12 und 13 sind hypervariabel. Deshalb werden diese auch als *repeat variable diresidue* (RVD) bezeichnet (Bonas *et al.*, 1989, 1993; Schornack *et al.*, 2006; Boch & Bonas, 2010). Anhand verschiedener Kombinationen von Aminosäuren der RVDs können die einzelnen *repeats* in *repeat*-Typen eingeteilt werden. Werden die Aminosäuren des RVD im Ein-Buchstaben-Code hintereinandergeschrieben, so erhält man die RVD-Sequenz eines TALEs. Die meisten TALEs enthalten eine *repeat*-Region mit 17,5 *repeats* (Boch & Bonas, 2010). Der letzte *repeat* eines TALEs umfasst meist nur 19 – 20 Aminosäuren und wird daher als halber *repeat* bezeichnet (Bonas *et al.*, 1989; Boch & Bonas, 2010).

1.3.1.1 Der TALE-Code

Nach der Entdeckung der ersten TAL-Effektoren konnte für die zentrale *repeat*-Region, relativ schnell eine wichtige Rolle in der Funktionsweise der TALEs nachgewiesen werden. In Studien bei denen *repeats* in der AvrBs3 *repeat*-Region deletiert wurden oder die *repeat*-Regionen der TALEs AvrXa10 und AvrXa7 getauscht wurden, konnte ein Verlust der Erkennung durch ein R-Gen (*Bs3*) bzw. eine vertauschte Aktivierung der Ziel-Gene in anfälligen und resistenten Pflanzen (Paprika bzw. Reis) beobachtet werden (Herbers *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Weiterhin konnten *in vitro* DNA-Bindungsstudien zeigen, dass AvrXa7 an doppelsträngige DNA und AvrBs3 direkt an den Promotorbereich der aktivierten Gene *UPA20* und *Bs3* bindet (Yang *et al.*, 2000; Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Somit konnte geschlussfolgert werden, dass TALEs

selbständig an Ziel-DNA binden können und die *repeat*-Region determiniert welche Sequenz gebunden wird (Yang *et al.*, 2000; Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Wie genau die *repeat*-Region die spezifische DNA-Bindung bestimmt war jedoch lange Zeit unklar. Weiterführende Studien mit dem TAL-Effektor AvrBs3 konnten den DNA-Abschnitt, an den AvrBs3 bindet, die sogenannte *upa*-Box (*upa* – *upregulated by AvrBs3*), eingrenzen sowie ein Kernelement von ca. 14-15 Basenpaaren (bp) identifizieren (Kay *et al.*, 2007; Römer *et al.*, 2007). Durch eine Korrelation der einzelnen *repeats* von AvrBs3 mit diesem Kernelement, konnte vermutet werden, dass ein *repeat* ein Nukleotid der DNA bindet, wobei die RVDs die Spezifität für die einzelnen Nukleotide bestimmen (Boch *et al.*, 2009). Dies konnte mit Hilfe von Reporterstudien experimentell bestätigt werden. Dafür wurden von verschiedenen TALEs anhand der RVD-Sequenz potentielle Zielsequenzen abgeleitet. Diese Zielsequenzen wurden zusammen mit einem minimalen, basal nicht aktiven, Promotor vor ein Reporter gen eingefügt. Die TALE-abhängige Aktivierung wurde dann mit Hilfe des Reporters überprüft (Boch *et al.*, 2009). Weiterhin konnten zur gleichen Zeit mit Hilfe von bioinformatischen Analysen, verschiedener TALEs und entsprechend bekannter Ziel-Gen-Promotoren, Korrelationen zwischen RVD-Sequenz und bestimmten Nukleotiden nachgewiesen werden (Boch *et al.*, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). Mit diesen beiden Studien konnte das Rätsel der DNA-Bindung der TALE *repeat*-Region gelöst und ein RVD-Code beschrieben werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass einige RVDs spezifisch für genau ein Nukleotid sind. Beispiele hierfür sind die RVDs HD (Histidin, Aspartat), welches spezifisch für das Nukleotid Cytosin ist, NI (Asparagin, Isoleucin) für Adenin und NG (Asparagin, Glycin) für Thymin (Abb. 1.2.1C). Andere RVDs können mehrere Nukleotide in der Ziel-DNA Sequenz erkennen bzw. tolerieren. Beispiele hierfür sind die RVDs NN (Asparagin, Asparagin), welches Guanin und Adenin erkennt sowie N* (welchem im Vergleich zu anderen RVDs die Aminosäure an Position 13 fehlt), welches Cytosin, methyliertes Cytosin und Thymin erkennen kann. Ein Spezialfall ist das RVD NS (Asparagin, Serin). NS kann alle vier Nukleotide einer DNA-Sequenz akzeptieren (Boch *et al.*, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass allen TALE Ziel-Sequenzen ein initiales Thymin vorangestellt ist. Dieses Thymin ist essentiell für die TALE-abhängige Genaktivierung (Römer *et al.*, 2009; Boch *et al.*, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009; Boch & Bonas, 2010).

Mit der Entschlüsselung des TALE RVD-Codes boten sich nun neue Möglichkeiten. Zum einen ist es jetzt relativ einfach möglich, die DNA-Sequenz, welche von einem TALE gebunden wird, anhand der RVD-Sequenz abzuleiten. Dies kann genutzt werden um neue pflanzliche Ziel-Gene zu identifizieren. Zum anderen ist es, auch aufgrund der modularen Bauweise von TALEs möglich, künstliche TALEs herzustellen. Wie mit einem Baukasten

können einzelne TALE-Module für die N- und C-terminale Region sowie *repeats* mit gewünschter RVD-Abfolge zusammengesetzt werden, um eine neue DNA-Bindedomäne mit nutzerdefinierter Ziel-DNA-Sequenz zu erstellen (Boch *et al.*, 2009; Boch & Bonas, 2010; Geißler *et al.*, 2011). Auf diese Weise ist es möglich, TALEs als biotechnologisches Werkzeug zu nutzen, um Gene regulieren, mutieren oder reparieren zu können (Boch & Bonas, 2010; Scholze & Boch, 2011).

1.3.1.2 Die Struktur von TALE-*repeats*

Lange Zeit war die Proteinstruktur von TALEs und somit auch der repetitiven *repeat*-Region unbekannt. Anfang 2012 konnten zwei Studien Licht ins Dunkel bringen, indem die Struktur von einem artifiziellen Hax3-basierten und einem natürlichen TALE (PthXo1) erfolgreich aufgeklärt werden konnte (Deng *et al.*, 2012a; Mak *et al.*, 2012). Dabei bildet die *repeat*-Region eine rechtsgewundene Superhelix, welche den *sense*-Strang der DNA bindet. Die RVDs sind dabei zur großen Furche ausgerichtet. Im Vergleich der TALEs zwischen DNA-gebundener und freier Form konnte festgestellt werden, dass der TALE durch die DNA Bindung eine Kompression erfährt (Deng *et al.*, 2012a).

Jeder *repeat* besteht aus einer kürzeren (Aminosäuren 3-11) und einer längeren (Aminosäuren 15-33) α -Helix, welche durch den sogenannten RVD-*loop* verbunden sind. Dieser besteht aus dem RVD sowie dem Glycin an Position 14 (Deng *et al.*, 2012a). Aufgrund der hohen Repetitivität der *repeats*, nimmt jeder *repeat* die gleiche Struktur an (Deng *et al.*, 2012a; Mak *et al.*, 2012). So entsteht eine sehr regelmäßige Einheit, welche die *repeat*-Region des TALEs bildet (Abb. 1.2.1D).

Anhand der Strukturaufklärung eines TALEs gebunden an DNA, konnten für die beiden Aminosäuren des RVD unterschiedliche Funktionen beschrieben werden. Die erste Aminosäure des RVD (Position 12 im *repeat*) ist nicht, wie vorher vermutet, an der Bindung des Ziel-Nukleotids beteiligt. Jedoch trägt sie durch *intra-repeat*-Interaktionen zur Stabilität des RVD-*loops* und somit zur Struktur des *repeats* bei (Deng *et al.*, 2012a; Mak *et al.*, 2012). Somit ist ausschließlich die zweite Aminosäure des RVD (Position 13 im *repeat*) für die Erkennung des Ziel-Nukleotids verantwortlich (Abb. 1.2.1E). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zwischen der Aminosäure an Position 13 und der DNA-Base, je nach Aminosäure, Wasserstoffbrücken oder van-der-Waals-Interaktionen ausgebildet werden (Deng *et al.*, 2012a; Mak *et al.*, 2012). Bei Betrachtung der an die *repeat*-Region angrenzenden N- und C-terminalen Bereiche, konnten zusätzliche degenerierte *repeats* identifiziert werden. Diese unterscheiden sich zwar stärker anhand ihrer Aminosäuresequenz von den *repeats*, weisen jedoch ebenfalls die typische *helix-loop-helix*-Struktur auf (Deng *et al.*, 2012a; Mak *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Tryptophan an Position 232, im degenerierten N-terminalen

repeat -1, für die Koordination des initialen Thymins verantwortlich ist (Deng *et al.*, 2012a; Mak *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012).

1.3.1.3 Verfeinerung und Ausnahmen des TALE-Codes

Mit der Aufklärung der Funktionen der beiden RVD-Aminosäuren und der Erkenntnis, dass ausschließlich die Aminosäure 13 für die Interaktion mit dem spezifischen Nukleotid verantwortlich ist, konnte der TALE-Code vereinfacht werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass generell alle RVDs mit der Aminosäure G an Position 13 Thymin und alle RVDs mit der Aminosäure D an Position 13 Cytosin erkennen. Für die Ableitung der Spezifität ist nur die Aminosäure 13 zu beachten (De Lange *et al.*, 2014; Boch *et al.*, 2014). Somit ist es möglich auch für seltenere RVDs, wie zum Beispiel SN, IG oder YG, eine Nukleotid-Spezifität vorherzusagen.

Nach und nach konnten nun auch experimentell weitere RVD-Spezifitäten aufgeklärt werden. So konnten in der Studie von Streubel *et al.* 2012 z.B. die Spezifitäten von HN, NT, NH und NK identifiziert werden. Mit den RVDs NH und NK konnten zwei RVDs beschrieben werden, welche ausschließlich Guanin erkennen (Streubel *et al.*, 2012). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass manche TALEs, trotz perfekter Ziel-DNA-Sequenz, nicht in der Lage waren das Reportergen anzuschalten. Die Aktivität dieser TALEs konnte durch das Einfügen der RVDs HD, NN oder NH wiederhergestellt werden (Streubel *et al.*, 2012). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass RVDs wie HD, NN oder NH einen positiven Einfluss auf die Gesamtaktivität haben. Andere RVDs wie NI, NG, NS oder NK haben nur einen schwachen bis gar keinen Einfluss auf die Gesamtaktivität eines TALEs (Streubel *et al.*, 2012). Demzufolge können RVDs in starke, wie HD und NN, intermediäre, wie NH, NS und schwache, wie NI, NG oder NK, eingeteilt werden. Diese Resultate decken sich mit den Erkenntnissen der Strukturaufklärung (Streubel *et al.*, 2012). So konnte gezeigt werden, dass die starken RVDs HD und NN Wasserstoffbrücken zu den korrespondierenden Nukleotiden ausbilden, wohingegen schwache RVDs wie NI oder NG nur van-der-Waals-Interaktionen ausbilden (Streubel *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2012). Mit Hilfe dieser Ergebnisse kann der TALE-Code verfeinert und Richtlinien zum Design von künstlichen TALEs aufgestellt werden (Streubel *et al.*, 2012; Meckler *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Boch *et al.*, 2014).

Wie zu jeder Regel gibt es auch zu den Regeln des TALE-Codes Ausnahmen. Generell bestehen TALE-*repeats* aus 34 Aminosäuren und sind hochkonserviert. Es gibt jedoch in manchen TALEs *repeats*, welche mehr oder weniger als 34 Aminosäuren aufweisen. Die am häufigsten auftretende Ausnahme ist der sogenannte letzte halbe *repeat*. Diesen findet man in jedem TALE. Bei diesem *repeat* sind nur die ersten 20 Aminosäuren konserviert (Boch & Bonas, 2010). Somit ist der letzte halbe *repeat* kürzer als ein normaler TALE-

repeat. Evolutionär gesehen bestand der letzte halbe *repeat* früher ebenfalls aus 34 AS, denn in der C-Terminalen Region schließen sich an den letzten halben *repeat* weitere schwach konservierte degenerierte *repeats* an (De Lange *et al.*, 2014). In der Studie von Zheng *et al.* 2014 wurde der Einfluss des halben *repeats* auf die Genaktivierung von TALEs getestet. Dafür generierten die Autoren künstliche TALEs, ohne halben *repeat* am Ende der *repeat*-Region. Diese künstlichen TALEs wurden dann transient in *N. benthamiana* und *in vivo* in Reis auf ihre Funktion getestet. Die Autoren konnten zeigen, dass der halbe *repeat* keinen Einfluss auf die Aktivität der künstlichen TALEs hat (Zheng *et al.*, 2014). Ein weiteres Beispiel für einen kürzeren *repeat* sind *repeats* mit den RVDs N*, H* oder S*. Bei diesen *repeats* ist die Aminosäure an Position 13 deletiert worden, wodurch sich die *repeats* wie *repeats* mit G an Position 13 verhalten und Thymin spezifizieren (Boch & Bonas, 2010).

Eine weitere Ausnahme sind die TALEs Hax2, AvrHah1 sowie die TALE-verwandten Proteine aus *Ralstonia solanacearum*. Diese bestehen im Gegensatz zu anderen TALE-Proteinen ausschließlich aus *repeats* von 35 Aminosäuren Länge und sind daher außergewöhnliche TALEs (Kay *et al.*, 2005; Schornack *et al.*, 2008; Boch *et al.*, 2009; de Lange *et al.*, 2013). Weiterhin findet man in den TALEs von Xoo und Xoc *repeats* von 30, 39, 40 oder 42 Aminosäuren Länge (Yang *et al.*, 2000; Boch & Bonas, 2010). Diese *repeats* werden als abberante *repeats* bezeichnet (Richter *et al.*, 2014). Die unterschiedlichen Längen der *repeats* können auf Deletionen oder Duplikationen von Teilen, einer der beiden α -Helices zurückgeführt werden. In der Studie von Richter *et al.*, 2014 konnte gezeigt werden, dass TALEs, welche einen 30er, 39/40er oder 42er *repeat* besitzen, neben der normalen Zielsequenz auch eine Zielsequenz mit einer Deletion binden können, wenn diese Deletion an der Stelle korrespondierend zu dem abberanten *repeat* ist. Damit konnte eine Ausnahme zur 1-*repeat*-1-Nukleotid-Hypothese entdeckt werden. Dies kann möglich sein, indem die abberanten *repeats* sich sowohl in die normale Struktur einfinden als auch vermutlich aus dieser Struktur hinausragen können (Richter *et al.*, 2014). Beispiele für TALEs mit solchen abberanten *repeats* sind die Xoo-TALEs PthXo1, PthXo2 oder AvrXa7 (Boch & Bonas, 2010; Richter *et al.*, 2014). Mit Hilfe der abberanten *repeats* ist es diesen TALEs wahrscheinlich möglich, Resistenzen durch eine Deletion in der TALE Zielsequenz zu überwinden und somit die Virulenz aufrechtzuhalten (Richter *et al.*, 2014).

1.3.2 TALEs als Virulenzfaktoren

Xanthomonaden nutzen TALEs um die Transkription von pflanzlichen Genen zu ihren Gunsten zu manipulieren (Abb. 1.2.1A). Pflanzengene, welche nach ihrer Aktivierung die Virulenz des Pathogens fördern, werden als Suszeptibilitätsgene (S-Gene) bezeichnet.

Eines der zurzeit bestuntersuchten Systeme der TALE-Wirt-Interaktion ist das *Xoo*-Reis-System. Reis ist eines der wichtigsten Nahrungsmittel der Welt (Izawa & Shimamoto, 1996; Niño-Liu *et al.*, 2006). Die Verfügbarkeit von Genomsequenzen zweier Arten *Oryza sativa* spp. *japonica* und *indica*, sowie Methoden zur Transformation und damit verbundenen Erstellung transgener Pflanzen machen Reis zu einem wichtigen molekularbiologischen Modellsystem zur Untersuchung von Pathogen-Pflanze-Interaktionen (Izawa & Shimamoto, 1996; Goff *et al.*, 2002; Kennedy, 2002; Yu *et al.*, 2002; Niño-Liu *et al.*, 2006). Die pathogenen Bakterien der Spezies *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sind die Verursacher der bakteriellen Weißblättrigkeit auf Reis (Niño-Liu *et al.*, 2006). Diese Krankheit kann zu äußerst hohen Ernteverlusten führen, weshalb es interessant ist, die *Xoo*-Reis-Interaktion zu studieren.

Xoo-Stämme besitzen bis zu 19 TALEs mit unterschiedlichem Beitrag zur Virulenz des Stammes (Schornack *et al.*, 2013). Einige TALEs können als Schlüssel-Virulenzfaktoren bezeichnet werden. Deletiert man diese TALEs, führt dies zum Verlust der Virulenz des jeweiligen Stammes (Bai *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Andere TALEs wiederum haben nur einen sehr geringen bis keinen bisher beschriebenen Einfluss auf die Virulenz des Stammes (Bai *et al.*, 2000; Yang & White, 2004; Yang *et al.*, 2006; Sugio *et al.*, 2007; Antony *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Daher ist die Suche nach TALE Zielgenen und die Analyse dieser wichtig, um die Funktion der einzelnen TALEs in der *Xoo*-Reis-Interaktion zu verstehen.

1.3.2.1 Bekannte Suszeptibilitätsgene von *Xoo*-TALEs

Trotz der großen Anzahl an TALEs in *Xoo*, sind nur für wenige davon Ziel-Gene bekannt. Die wohl am besten untersuchte Gruppe von Ziel-Genen sind die *OsSWEET*-Gene aus Reis, welche für Saccharose- und Glucose-Transporter kodieren (Yang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011; Yuan & Wang, 2013). Die *OsSWEET*-Familie in Reis besteht aus ca. 20 Mitgliedern. Sie können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Chen *et al.*, 2010). Für die Gene der Gruppe III konnte bereits die Funktion als Saccharose-Transporter nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013a; Streubel *et al.*, 2013). Die TALE-abhängige Induktion von *OsSWEET*-Genen der Gruppe III könnte *Xoo* mit Zucker versorgen und so die Ernährung der Pathogene sichern (Chen *et al.*, 2010; Streubel *et al.*, 2013; Chen, 2014; Boch *et al.*, 2014). Insgesamt sind bisher sechs TALEs aus verschiedenen *Xoo*-Stämmen von verschiedener Herkunft (Afrika und Asien) bekannt, die eines der Mitglieder der *OsSWEET*-Genfamilie aktivieren (Abb. 1.3.1A). Keine andere bisher bekannte Genfamilie wird von mehr unterschiedlichen TALEs aktiviert (Boch *et al.*, 2014). Daraus kann geschlossen werden, dass die Gene der Gruppe III *OsSWEET*-Familie Schlüssel-Suszeptibilitätsgene in der *Xoo*-Reis-

Interaktion sind. Bisher konnten drei Gene der Gruppe III *OsSWEETs* als Suszeptibilitätsgene identifiziert werden. *OsSWEET11* wird von dem TALE PthXo1 und *OsSWEET13* von dem TALE PthXo2 aktiviert (Yang *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2015). Das Gen *OsSWEET14* wird von den TALEs PthXo3, AvrXa7, TalC und Tal5 aktiviert (Abb. 1.3.1A). Somit aktivieren vier verschiedene TALEs aus verschiedenen *Xoo*-Stämmen, ein und dasselbe Gen (Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Streubel *et al.*, 2013; Boch *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015). Die Deletion eines dieser *OsSWEET*-induzierenden TALEs führt zum Verlust der Virulenz des jeweiligen Stammes auf suszeptiblen Reispflanzen (Bai *et al.*, 2000; Yang & White, 2004; Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Weiterhin kann die Virulenz eines TALE-defizienten *Xoo*-Stamms durch die Expression eines TALEs, welcher ein *OsSWEET*-Gen induziert, wiederhergestellt werden (Verdier *et al.*, 2012; Streubel *et al.*, 2013). Somit zählen diese TALEs zu den wichtigsten Virulenzfaktoren von *Xoo* und werden deshalb auch als Schlüssel-Virulenzfaktoren bezeichnet.

Weitere bekannte Suszeptibilitätsgene aus Reis sind *OsHen1*, *OsTFX1* und *OsTFIIA γ 1*. Das Gen *OsHen1* wird durch den TALE PthXo8 induziert und kodiert für eine Methyltransferase, welche vermutlich die Stabilität kleiner RNAs beeinflusst (Moscou & Bogdanove, 2009; Boch *et al.*, 2014). Der Beitrag der Aktivierung von *OsHen1* auf die Virulenz von *Xoo* ist jedoch bisher nicht bekannt. Interessanterweise ist *OsHen1* das bisher einzige Suszeptibilitätsgen, welches sowohl von einem *Xoo*- als auch von einem *Xoc*-TALE induziert wird (Moscou & Bogdanove, 2009; Grau *et al.*, 2013; Cernadas *et al.*, 2014; Hutin *et al.*, 2015). *Xoc* ist ebenfalls ein Reispathogen und weist mit bis zu 26 TALEs pro Stamm noch mehr TALEs auf als *Xoo* (Schornack *et al.*, 2013; Cernadas *et al.*, 2014). Die anderen beiden Suszeptibilitätsgene, für die ein Einfluss auf die Virulenz von *Xoo* nachweisbar ist, sind Transkriptionsfaktoren. *OsTFX1* wird von PthXo6 aktiviert (Sugio *et al.*, 2007; Boch *et al.*, 2014). Dieser TALE ist neben PXO99 in vielen weiteren *Xoo*-Stämmen vertreten. Die Deletion des TALEs führt nicht zum kompletten Verlust der Virulenz von PXO99 sondern vermindert diese lediglich (Sugio *et al.*, 2007). Somit ist ein positiver Einfluss von PthXo6 auf die Virulenz nachweisbar. Dieser Einfluss ist jedoch wesentlich geringer als der der *OsSWEET*-Gene. *OsTFIIA γ 1* wird vom TALE PthXo7 induziert und kodiert für eine γ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors IIA (TFIIA; Sugio *et al.*, 2007; AS Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2008). Dieses Suszeptibilitätsgen ist nur für die Interaktion mit einer bestimmten Reissorte (IRBB5) wichtig, welche eine Mutation in einem Allel von *OsTFIIA γ 5* trägt (Sugio *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009). Die Deletion anderer TALEs hat entweder nur eine geringe oder gar keine Bedeutung für die Virulenz von *Xoo*. Die Zielgene der meisten TALEs sind bisher unbekannt. Um zu verstehen welche Gene in der

Pflanze für die Pathogene wichtig sind, ist es notwendig die Zielgene aller TALEs zu identifizieren.

1.3.2.2 Weitere bekannte Ziel-Gene anderer *Xanthomonas spp.*

Anders als *Xoo* und *Xoc* haben andere *Xanthomonas spp.* eine wesentlich geringere Anzahl an TALEs. Doch auch von diesen sind nur wenige Ziel-Gene bekannt. Für die TALEs der PthA-Familie aus *Xanthomonas citri (Xc)*-Stämmen, konnte eine Induktion des Transkriptionsfaktors *CsLOB1* gezeigt werden (Hu *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014). Durch den Transfer von PthA in einen kaum virulenten *Xc*-Stamm und die Deletion von PthA in dem *Xc*-Stamm 3213, konnte der TALE PthA als Pathogenitätsfaktor identifiziert werden (Swarup *et al.*, 1991). Die Aktivierung von *CsLOB1* ist für die Virulenz von *Xc*-Stämmen essentiell (Duan *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014). Ein weiteres Beispiel ist der TALE *AvrBs3* aus *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (Xcv; Bonas et al., 1989)*.

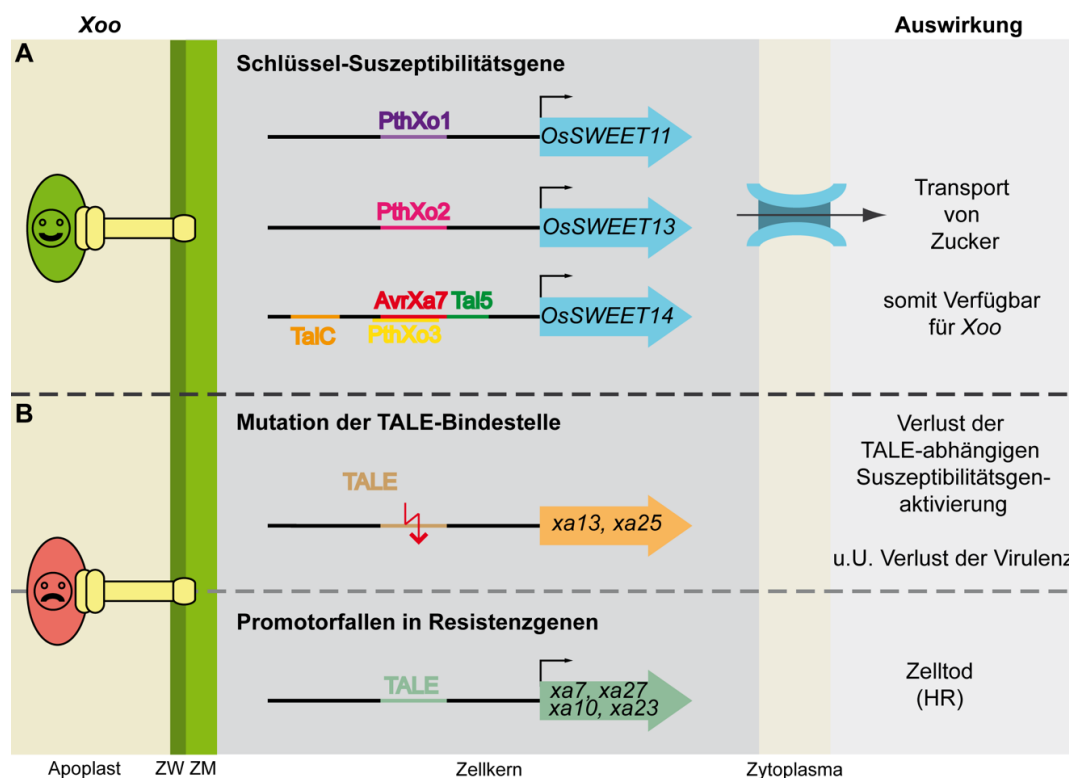


Abbildung 1.3.1 TALEs und ihre Ziel- und Resistenzgene

A) Dargestellt sind bekannte Schlüssel-Suszeptibilitätsgene für TALEs aus *Xanthomonas oryzae pv. oryzae (Xoo)*. Die Induktion der Expression dieser Gene ist für die Virulenz der entsprechenden *Xoo*-Stämme essentiell. Die TALE-abhängige Aktivierung dieser Suszeptibilitätsgene trägt wahrscheinlich zur Versorgung des Bakteriums mit Nährstoffen bei. **B)** Dargestellt sind zwei der bekannten Resistenzmechanismen, die zur Erkennung von TALEs aus *Xoo* führen bzw. deren DNA-Bindung und Aktivität verhindern. Durch die Mutation der TALE-Bindestelle im Promotor von Ziel-Genen wird die TALE-abhängige Aktivierung des entsprechenden Gens verhindert. Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die TALE-abhängige Aktivierung von Resistenzgenen. Dies führt über bisher häufig unbekannte Signalwege zur Auslösung der hypersensitiven Reaktion (HR, oben). ZW - Zellwand; ZM - Zellmembran; HR – hypersensitive Reaktionen.

Für diesen TALE sind zehn aktivierte Gene bekannt. Eines von ihnen ist der *basic-helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor *Upa20* (Kay *et al.*, 2007, 2009). Durch die Aktivierung von *Upa20* kommt es zu einem Anschwellen des Blattgewebes. Es wird vermutet, dass dies genutzt wird um die Verbreitung von *Xcv* zu gewährleisten. Jedoch ist der Einfluss von *AvrBs3* auf die Virulenz von *Xcv* noch nicht abschließend geklärt (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007).

1.3.3 TALE-abhängige Resistenzen

1.3.3.1 Rezessive Resistenzgene

Pflanzen haben verschiedene Möglichkeiten entwickelt, um sich gegen die Manipulation mit TALEs zu schützen. Rezessive Resistenzgene sind Anpassungen von Pflanzen durch Mutationen von bestimmten Bereichen, welche für die Funktion von TALEs essentiell sind. Eine dieser Anpassungen ist die Mutation der Bindestelle des TALEs im Promotorbereich des Zielgens. Somit kann das Gen für die Pflanze noch die gewünschte Funktion erfüllen, der TALE jedoch ist nicht länger in der Lage, im Promotor zu binden und die Transkription des Gens zu aktivieren. Beispiele für diese Art der pflanzlichen Resistenz sind die rezessiven Resistenzgene *xa13* (*OsSWEET11*) und *xa25* (*OsSWEET13*). Diese beiden Allele der *OsSWEET*-Gene enthalten Insertionen bzw. Deletionen im Promotorbereich, sodass die korrespondierenden TALEs, *PthXo1* bzw. *PthXo2*, diese nicht aktivieren können (Chu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2015). Durch die fehlende Aktivierung der Suszeptibilitätsgene sind die *Xoo*-Stämme nicht länger virulent und die Reispflanzen resistent (Abb. 1.3.1B).

Eine weitere Möglichkeit der Pflanzen sich gegen die Manipulation von TALEs zu schützen, ist die Mutation eines TALE Interaktionspartners. Somit kann ebenfalls die Aktivierung des Zielgens verhindert werden. Das bisher einzige Beispiel hierfür sind Reislinien mit dem Resistenzgen *xa5* (Iyer & McCouch, 2004; Gu *et al.*, 2009). Dieses Gen kodiert für die γ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIIA (*OsTFIIA γ 5*). Es besitzt, im Vergleich zum Wildtyp *OsTFIIA γ 5*, einen einzelnen Aminosäureaustausch an Position 39 von Valin (V) zu Glutaminsäure (E). Generell besitzt Reis zwei Allele der γ -Untereinheit von TFIIA. Ein Allel auf Chromosom 1 (*OsTFIIA γ 1*), welches natürlicherweise kaum exprimiert wird und das hauptsächlich exprimierte Allel auf Chromosom 5 (*OsTFIIA γ 5*; Iyer & McCouch, 2004). Der Transkriptionsfaktor TFIIA ist Bestandteil des Präinitiationskomplexes (PIC) der RNA-Polymerase-II und somit wichtig für die transkriptionelle Aktivierung von Genen (Orphanides *et al.*, 1996; Thomas & Chiang, 2006). Der Aminosäureaustausch in dem mutierten Allel *xa5* hat keinen Einfluss auf die Funktion von TFIIA im PIC. Jedoch wird durch diese Mutation die TALE-abhängige Aktivierung von Ziel-Genen verringert (Iyer & McCouch, 2004; Sugio *et al.*, 2007; Gu *et*

al., 2009). So ist zum Beispiel der *Xoo*-Stamm PXO86, welcher den TALE AvrXa7 besitzt, auf homozygoten *xa5* Reispflanzen nicht virulent (Sugio *et al.*, 2007). Vermutlich wird das Schlüssel-Suszeptibilitätsgen *OsSWEET14* nicht ausreichend aktiviert (Iyer & McCouch, 2004; Sugio *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009). Interessanterweise kann der *Xoo*-Stamm PXO99 diese Resistenz umgehen. Mit Hilfe des TALEs PthXo7 induziert PXO99 die Transkription des *OsTFIIAγ1*-Allels und kann die Mutation von *OsTFIIAγ5* komplementieren. Dadurch ist PXO99 in der Lage, auf homozygoten *xa5* Reispflanzen Krankheitssymptome auszulösen (Sugio *et al.*, 2007). Dies ist ein exzellentes Beispiel für das Wettrüsten zwischen Pflanzen und Pathogenen, bei dem man sehen kann, wie Pathogene Resistenzen überwinden können.

1.3.3.2 Dominante Resistenzgene

Der am weitesten verbreitete TALE-abhängige Resistenzmechanismus ist die sogenannte Promotorfalle. Das Prinzip der Promotorfallen ähnelt dem der *Guard*-Hypothese. Im Promotorbereich dieser Resistenzgene befindet sich eine TALE-Bindestelle (Schornack *et al.*, 2013). Somit kann der TALE im Promotor des Resistenzgens binden und schaltet dieses an. Daraufhin werden weitere Abwehrmechanismen eingeleitet, die in den meisten Fällen zu einer HR führen. Somit bieten Promotorfallen den Pflanzen eine Möglichkeit, unmittelbar die Aktivität von TALEs zu detektieren und Abwehrmaßnahmen einzuleiten (Rouxel & Balesdent, 2010; Schornack *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Bisher konnten nur für einige TALEs solche Resistenzgene identifiziert werden. Jedoch besitzen die bisher gefundenen Resistenzgene keine große Ähnlichkeit untereinander. Dies erschwert die Suche nach weiteren Resistenzgenen. Weiterhin sind die nachgeschalteten Signalwege, über welche die Abwehrreaktionen ausgelöst werden, noch weitestgehend unklar. Somit ist bisher nur der Mechanismus der Promotorfallen an sich bekannt.

Eines der bekanntesten Beispiele ist das Resistenzgen *Bs3*. Es ist in resistenten ECW-30R Paprikapflanzen zu finden und wird durch den *Xcv* TALE AvrBs3 sowie den *Xanthomonas gardneri* TALE AvrHah1 aktiviert (Schornack *et al.*, 2008). *Bs3* weist Homologien zu Flavin-Monooxygenasen auf. Der Mechanismus, wie die HR eingeleitet wird, ist bisher noch unklar (Römer *et al.*, 2007). Die meisten anderen TALE-abhängigen Resistenzgene sind aus der *Xoo*-Reis-Interaktion bekannt (Schornack *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Beispiele hierfür sind die Gene *Xa7*, *Xa10*, *Xa23* und *Xa27* die durch die entsprechenden TALEs AvrXa7, AvrXa10, AvrXa23 und AvrXa27 aktiviert werden (Abb. 1.3.1B; Rouxel & Balesdent, 2010; Wang *et al.*, 2014b,a; Zhang *et al.*, 2015). Jedoch weisen alle bisher identifizierten dominanten Resistenzgene Besonderheiten auf. So ist eine Resistenz über das Resistenzgen *Xa7*, welches durch den TALE AvrXa7 aktiviert wird, äußerst vorteilhaft für die Pflanzen (Vera Cruz *et al.*, 2000; Antony *et al.*, 2010). Denn

diese Resistenz ist für die *Xoo*-Stämme nicht leicht zu umgehen, da der TALE AvrXa7 das Schlüssel-Suszeptibilitätsgen *OsSWEET14* aktiviert. Durch eine Mutation des TALEs, um die Resistenz der Pflanzen zu umgehen, würde ebenfalls die Virulenz der *Xoo*-Stämme verloren gehen (Antony *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Somit scheint die Resistenz, vermittelt durch *Xa7*, eine sehr sichere Resistenz zu sein. Das R-Gen *Xa10* gehört zu den wenigen R-Genen, welches kloniert und für das eine Funktion beschrieben werden konnte. *Xa10* kodiert für ein 126 Aminosäure großes Protein, welches in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Dort ist es vermutlich in den Calcium-Ausstoß involviert (Tian *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Calcium fungiert in pflanzlichen Zellen als Signaltransmitter und löst z.B. einen respiratorischen Burst und damit weitere Abwehrreaktionen aus (Grant *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2015). Ein weiteres kloniertes Resistenzgen ist *Xa23*. Es weist eine 50%ige Identität in der Proteinsequenz zu *Xa10* auf. Demnach ist es möglich, dass *Xa23* auf eine sehr ähnliche Art und Weise wie *Xa10* Abwehrreaktionen einleitet (Wang *et al.*, 2015). Dies konnte jedoch bisher nicht experimentell bestätigt werden. Weiterhin ist die Resistenz vermittelt durch *Xa23* zusammen mit *Xa27* interessant, da die jeweiligen TALEs, AvrXa23 und AvrXa27, in sehr vielen verschiedenen *Xoo*-Stämmen vorkommen. Somit hat die durch *Xa23* und *Xa27* vermittelte Resistenz ein breites Wirkspektrum gegenüber vielen *Xoo*-Stämmen (Gu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014b,a, 2015). Dabei löst die Aktivierung von *Xa23* sowohl in monokotyledonen als auch in dikotyledonen Pflanzen eine HR aus (Wang *et al.*, 2014b). Das Resistenzgen *Xa27* wurde bereits für die Erstellung transgener resistenter Reissorten verwendet (Hummel *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). Dabei wurde ein Promotor mit mehreren TALE-Bindestellen an das *Xa27*-Gen fusioniert und in Reispflanzen integriert. Somit konnte die Resistenz dieser Reispflanzen auf weitere *Xoo*-Stämme ausgeweitet werden (Hummel *et al.*, 2012). Für die Funktion der bisher beschriebenen Resistenzgene ist die Kernlokalisierung, die DNA-Bindung und die Aktivierung von Genen essentiell. Das zurzeit einzige bekannte Beispiel für eine Protein-vermittelte Erkennung von TALEs ist die Erkennung von AvrBs4 durch das Resistenzprotein Bs4 aus Tomate (Schornack *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2015). Dieses Resistenzprotein ist auch in der Lage, weitere TALEs wie z.B. Hax3 und Hax4 zu erkennen (Schornack *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2005). Der Mechanismus der TALE-Erkennung durch Bs4 ist allerdings noch nicht aufgeklärt.

1.3.4 TALEs als molekularbiologische Werkzeuge

1.3.4.1 Erstellung benutzerdefinierter künstlicher TALEs

Seit der Entschlüsselung des TALE-Codes ist es möglich, TALEs künstlich zu erstellen (Boch *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Dadurch hat man nun die Möglichkeit fast jede beliebige DNA-Sequenz durch ein individuell designtes Protein zu binden. Aufgrund der

hohen Repetitivität der *repeat*-Domäne ist es sehr schwierig, TALEs mit Hilfe PCR-basierter Methoden zu klonieren (Geißler *et al.*, 2011). Der modulare Aufbau der TALEs bietet jedoch die Möglichkeit sie mit Hilfe anderer Klonierungsstrategien, wie dem „*Golden Gate Cloning*“ (GGC) oder dem „*Ligation independent Cloning*“, zu klonieren (Aslanidis & de Jong, 1990; Geu-Flores *et al.*, 2007; Engler *et al.*, 2008, 2009; Schmid-Burgk *et al.*, 2013; Engler & Marillonnet, 2014). Mit der Zeit wurden eine Reihe von TALE-Klonierungstechniken entwickelt. Die meisten basieren auf der Methode des „*Golden Gate Cloning*“ (Cermak *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2011; Geißler *et al.*, 2011; Reyon *et al.*, 2012; Sanjana *et al.*, 2012; Engler *et al.*, 2014). Diese Methode basiert auf der Nutzung von Typ-IIs-Restriktionsenzymen. Diese Restriktionsenzyme zeichnen sich dadurch aus, dass sie außerhalb ihrer DNA-Erkennungssequenz schneiden. Dadurch kann man Restriktionsfragmente so entwerfen, dass diese ohne zusätzliche unerwünschte Sequenzen zu einem Konstrukt zusammengefügt werden können (Engler *et al.*, 2008, 2009). Dies macht man sich zunutze, um relativ einfach komplexe Konstrukte, wie z.B. TALEs, zu erstellen (Weber *et al.*, 2011; Geißler *et al.*, 2011; Engler *et al.*, 2014). Eine der ersten Klonierungstechniken, um TALEs zu erstellen, war die „*Golden TALE Technology*“ (Geißler *et al.*, 2011). Bei dieser und anderen GGC-basierten Techniken werden die TALEs mit Hilfe einer Modul-Bibliothek in einem Zwei-Schritt-Prozess assembliert (Weber *et al.*, 2011; Geißler *et al.*, 2011; Sanjana *et al.*, 2012). Als Grundgerüst für die artifiziellen TALEs dient der natürliche TALE Hax3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Boch *et al.*, 2009; Geißler *et al.*, 2011; Streubel *et al.*, 2012). Im ersten Schritt wird die *repeat*-Domäne mit der gewünschten DNA-Spezifität erstellt. Dafür wird eine *repeat*-Bibliothek, in der die *repeat*-Typen (RVDs) NI, HD, NN und NG zur spezifischen DNA-Erkennung vorgesehen sind, genutzt. So werden, je nach Länge der zu bindenden DNA-Sequenz und des korrespondierenden TALEs, 1-5 Hexa-*repeat*-Module erstellt. Als nächstes werden diese Hexa-*repeat*-Module zusammen mit einem Modul für den N- und C-terminalen Bereich zum kompletten TALE zusammengesetzt (Geißler *et al.*, 2011; Streubel *et al.*, 2012). Auf diese Weise können relativ schnell und einfach nutzer-definierte Transkriptionsfaktoren generiert werden. Dabei können TALEs nicht nur zur Induktion der Genexpression in Pflanzen, sondern auch in anderen Organismen genutzt werden (Morbiter *et al.*, 2010; Scholze & Boch, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Geißler *et al.*, 2011; Bogdanove & Voytas, 2011). Dies ist möglich, indem man die im C-terminalen Bereich gelegene Aktivierungsdomäne durch eine im Ziel-Organismus funktionale Aktivierungsdomäne ersetzt (Geißler *et al.*, 2011; Perez-Pinera *et al.*, 2013; Maeder *et al.*, 2013; Uhde-Stone *et al.*, 2014).

1.3.4.2 TALEs zur Induktion und Repression der Genexpression in verschiedenen Organismen

TALEs können relativ einfach erstellt werden um eine gewünschte DNA Sequenz zu binden. Es konnte gezeigt werden, dass maßgeschneiderte TALEs effektiv zur Geninduktion in verschiedenen Organismen genutzt werden können. Dabei ist eine Erhöhung der Genexpression um ein Vielfaches zu beobachten. In pflanzlichen Zellen konnten so z.B. die Arabidopsis-Gene *EGL3* und *KNAT1* induziert werden (Morbitzer *et al.*, 2010). Dafür wurden artifizielle TALEs mit der natürlichen TALE-Aktivierungsdomäne verwendet. In humanen- oder anderen Säugetier-Zellen können gute Geninduktionsraten erzielt werden, wenn die natürliche TALE-Aktivierungsdomäne durch die VP16-Aktivierungsdomäne, des *Herpes Simplex* Virus, oder ihr tetrameres Derivat VP64 ersetzt wird (Zhang *et al.*, 2011; Geißler *et al.*, 2011). So konnte z.B. die Expression der humanen endogene *PUMA*, *INF α 1*, *INF β 1* (Geißler *et al.*, 2011) sowie *SOX2* und *KLF4* (Zhang *et al.*, 2011) induziert werden.

Analog zur TALE-abhängigen Induktion der Genexpression konnte auch die TALE-abhängige Repression von Genen erreicht werden. In pflanzlichen und tierischen Zellen wurde dies durch das Ersetzen der TALE-Aktivierungsdomäne mit einer Repressor-Domäne, wie z.B. der SRDX, SID- oder KRAB-Domäne, erreicht (Cong *et al.*, 2012; Mahfouz *et al.*, 2012; Garg *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu reicht es in Hefezellen aus die TALE-Aktivierungsdomäne zu deletieren, um die Genexpression zu reprimieren (Blount *et al.*, 2012).

Jedoch ist bisher nicht vollkommen aufgeklärt, wie die TALE-abhängige Geninduktion funktioniert und welche Kriterien für eine erfolgreiche Geninduktion eingehalten werden müssen. Vor allem für TALEs mit der natürlichen Aktivierungsdomäne ist bisher wenig über Interaktionspartner und den Mechanismus der Initiation der Transkription bekannt (Streubel *et al.*, 2017). Es wird vermutet, dass TALEs direkt den PIC rekrutieren können. Dafür spricht, dass sich der Transkriptionsstart von TALE-abhängig induzierten Genen verschieben kann (Kay *et al.*, 2007; Romer *et al.*, 2009; Antony *et al.*, 2010; Hummel *et al.*, 2012; Streubel *et al.*, 2017). Die Rekrutierung könnte über die Interaktion mit Hilfsproteinen ablaufen. Ein Hinweis dafür gibt das bereits beschriebene Resistenzallel *xa5*, welches für eine mutierte Variante der γ -Untereinheit von TFIIA kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass TALEs direkt mit der α - und γ -Untereinheit von TFIIA interagieren werden (Yuan *et al.*, 2016).

Weiterhin ist für eine erfolgreiche Geninduktion vermutlich der Kontext des Promotors wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass selbst eine perfekte TALE-Box alleine nicht ausreicht um ein Gen zu aktivieren (Scholze & Boch, 2011; Bultmann *et al.*, 2012). Somit sind für die TALE-abhängige Geninduktion wahrscheinlich andere Promotorelemente

sowie die Zugänglichkeit des Promotors für den TALE und andere Proteine wichtig (Streubel *et al.*, 2017). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass DNA-Methylierung im Promotor eine Bindung von TALEs an ihre Zielsequenz verhindern kann (Bultmann *et al.*, 2012). Der Grund dafür ist, dass das Cytosin-spezifische RVD HD keine methylierten Cytosine bindet. Somit kann die Bindung des gesamten TALEs verhindert werden (Valton *et al.*, 2012; Bultmann *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2012b). Dies kann jedoch beim Design des TALEs, soweit bekannt ist welche Cytosine methyliert sind, umgangen werden. Die Thymin-spezifischen RVDs H*, N* oder NG können in diesem Falle zur Bindung von methylierten Cytosinen verwendet werden (Valton *et al.*, 2012; Bultmann *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2012b). Weiterhin kann beobachtet werden, dass viele natürliche TALEs in der Nähe der TATA-Box binden und ihre Ziel-Gene aktivieren (Grau *et al.*, 2013). Es ist jedoch bisher unklar was benötigt wird, damit ein TALE ein Gen aktivieren kann. Daher ist es wichtig zu studieren welche Elemente für eine TALE-abhängige Geninduktion wichtig sind.

1.4 Genome Editing

Das Genom eines Lebewesens enthält die DNA-Sequenz, welche die Informationen für das zelluläre Leben kodiert. Durch die Entwicklung und Verbesserung von DNA-Sequenzierungsmethoden konnten nach und nach immer größere DNA-Abschnitte sequenziert werden. Dadurch war es in den letzten 10-15 Jahren möglich, viele Genome von Mikroben, Pflanzen, Tieren und des Menschen zu sequenzieren und zu annotieren. Die komplette Genomsequenz einer Spezies bietet nun neue Informationen für Wissenschaftler um biologische Systeme und Netzwerke besser verstehen zu lernen. Dabei bietet das Genom zwei Arten von Informationen. Als erstes die Gene, welche für die Entwicklung und physiologische Funktion verantwortlich sind. Als zweites die Kontrollelemente, welche die Expressionslevel einzelner Gene regulieren. Gene und Kontrollelemente bilden zusammen mit anderen Genen regulatorische Netzwerke aus, welche im Zusammenspiel alle wichtigen Entwicklungs- und physiologischen Funktionen einleiten und ausüben. Eine wichtige methodische Vorgehensweise, um Genfunktionen in Organismen zu studieren, ist die Reverse Genetik (Gaj *et al.*, 2013). Dabei wird als erstes das zu untersuchende Gen auf DNA-Ebene mutiert. Anschließend wird untersucht wie sich die Mutation des Gens auf die Funktion der Zelle oder des Organismus auswirkt. Lange Zeit wurde nach einer Möglichkeit gesucht um vor allem pflanzliche, tierische und menschliche DNA zielgerichtet zu verändern. So stellt sich die Frage: Wie kann man eine zielgerichtete Veränderung von pflanzlichen oder menschlichen Genomen erreichen? Anders als in Bakterien oder Hefen, ist in höheren Eukaryoten keine einfache Homologe Rekombination möglich um das Genom zu verändern. Daher macht man es sich zunutze,

dass in jeder Zelle Doppelstrangbrüche (DSB) als mögliche lethale Gefahr eingestuft und sofort repariert werden (Kanaar *et al.*, 1998; Pastwa & Błasiak, 2003; Wyman & Kanaar, 2006; Steinert *et al.*, 2016). Somit wird die Integrität des Genoms aufrecht gehalten. Um einen DSB zu beheben, können Zellen auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückgreifen. (Carroll, 2014; Gaj *et al.*, 2016). Der Erste ist *homology-directed repair* (HDR). Mit Hilfe dieses Mechanismus wird die DNA-Sequenz eins zu eins korrekt repariert. Dazu wird eine homologe DNA-Matrize benötigt (Puchta, 2004; Moynahan & Jasin, 2010; Steinert *et al.*, 2016). Diese kommt in den allermeisten Fällen von dem unbeschädigten Schwester-Chromatid oder einem homologen Chromosom (Puchta & Fauser, 2013). Ähnlich der einfachen homologen Rekombination von Bakterien wird dabei nach dem *copy-and-paste*-Prinzip die beschädigte Sequenz wiederhergestellt. Mit Hilfe des HDR-Mechanismus ist es möglich, im Genom eines Zielorganismus Gene zu korrigieren, zu deletieren oder hinzuzufügen (Abb. 1.4.1B; Puchta & Fauser, 2013; Gaj *et al.*, 2013; Malzahn *et al.*, 2017). Der zweite Mechanismus ist das sogenannte *non-homologous end joining* (NHEJ). Hierbei werden die beiden Enden des DSBs, ohne Rücksicht auf Homologie, miteinander verbunden (Pastwa & Błasiak, 2003). Durch diese Art der Ligation des DNA-Strangs entstehen kleine Insertionen oder Deletionen (InDels), welche Veränderungen in der DNA-Sequenz erzeugen (Lieber, 2008, 2010). In vielen Zelltypen ist die Anzahl von NHEJ-Ereignissen sehr viel höher als die der HDR-Ereignisse. So ist es möglich mit Hilfe des NHEJ-Mechanismus im Genom eines Zielorganismus Gene zu mutieren, Tags zu ligieren oder genomische Bereiche zu deletieren (Abb. 1.4.1A; Puchta & Fauser, 2013; Gaj *et al.*, 2013; Malzahn *et al.*, 2017). Die Schlussfolgerung davon ist, dass man mit molekularen Werkzeugen, welche zielgerichtet und genau DSBs in chromosomale DNA einfügen können, sowohl lokale Mutationen via NHEJ generieren als auch Gene via HDR editieren kann. Somit ist es möglich, pflanzliche, tierische und menschliche Genome zu bearbeiten (Gaj *et al.*, 2013; Kim & Kim, 2014; Carroll, 2014; Malzahn *et al.*, 2017).

1.4.2 Zink-Finger-Nukleasen (ZFN)

Lange Zeit suchten Wissenschaftler nach geeigneten Werkzeugen um zielgerichtet DSBs in den DNA-Doppelstrang einzufügen. Dafür benötigte man eine modifizierbare DNA-Bindedomäne sowie eine DNA-Spaltungsdomäne. Ein erster großer Schritt effiziente Werkzeuge zu generieren war die Entdeckung von Zink-Finger-Proteinen (ZFP).

ZFP sind eine Klasse von Nukleinsäure-bindenden Proteinen, die eine bestimmte Domäne, die Zink-Finger-Domäne, besitzen. Bei der Zink-Finger-Domäne wird koordinativ ein Zinkion gebunden. Dadurch nimmt die Domäne eine schleifenförmige Struktur, den sogenannten Zink-Finger, an (Klug, 2010). Die Cys₂-His₂ Zink-Finger-Domäne gehört zu

den verbreitetsten DNA-Bindemotiven, die in Eukaryoten gefunden werden (Beerli & Barbas, 2002; Gaj *et al.*, 2013). Jeder einzelne Zink-Finger besteht aus circa 30 Aminosäuren, welche zwei β -Faltblätter und eine α -Helix bilden (Abb. 1.4.2). Ein Zink-Finger interagiert, mit Hilfe von Aminosäuren an der Oberfläche der α -Helix, mit 3 Basenpaaren in der großen Furche der DNA (Pabo *et al.*, 2001; Carroll, 2014). Somit können Zink-Finger mit unterschiedlichen Aminosäuren an der Oberfläche der α -Helix verschiedene DNA-Bindenspezifitäten haben (Porteus & Carroll, 2005; Gaj *et al.*, 2013). Durch die modulare Struktur der Zink-Finger-Proteine konnten diese genutzt werden, um benutzerdefinierte DNA-Binde-Proteinen zu erstellen. Dafür wurden zunächst künstliche Zink-Finger-Arrays, mit mehr als 3 Zink-Fingern entwickelt. Somit können DNA-Sequenzen von 9-18 bp-Länge durch künstliche Zink-Finger-Proteine gebunden werden. Dies war ein sehr wichtiger Schritt für die Verwendung von ZFP als benutzerdefinierte DNA-Binde-Proteine, denn eine DNA-Sequenz von 18 bp Länge kann in 68 Milliarden Basenpaaren DNA, Spezifität gewährleisten (Liu *et al.*, 1997; Beerli *et al.*, 1998, 2000; Gaj *et al.*, 2013). Somit kann sichergestellt werden, dass ein ZFP, welches 18 bp spezifiziert, in einem Genom spezifisch an die gewünschte Sequenz bindet. Um die Spezifitäten der Zink-Finger ändern zu können, wurden verschiedene Methoden entwickelt. So konnten z.B. mit Hilfe eines Phagen-Displays Zink-Finger mit Spezifitäten für alle 5'-GNN Triplets und viele der 5'-ANN und 5'-CNN Triplets isoliert werden (Choo & Klug, 1994a,b; Greisman & Pabo, 1997; Segal *et al.*, 1999; Dreier *et al.*, 2001, 2005). Mit Hilfe einer solchen Zink-Finger-Bibliothek, mit den verschiedensten Triplet-Spezifitäten, können nun neue Zink-Finger-Arrays für verschiedenste Zielsequenzen erstellt und genutzt werden (Carroll *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Bhakta *et al.*, 2013).

Um eine spezifische Nuklease zu erstellen, benötigte man jedoch noch eine geeignete DNA-Spaltungsdomäne. Diese fand man in der Restriktionsendonuklease *FokI*. *FokI* gehört zu der Gruppe der Typ IIS-Restriktionsenzyme. Diese Enzyme schneiden, im Gegensatz zu anderen Restriktionsenzymen, außerhalb ihrer DNA-Erkennungssequenz (Li *et al.*, 1992). Chandrasegaran *et al.* ist es gelungen, die DNA-Erkennungs- und die DNA-Spaltungsaktivitäten des *FokI*-Enzyms in zwei separate Fragmente zu teilen. Somit konnten sie unter anderem eine nicht spezifische Nuklease herstellen (Kim & Chandrasegaran, 1994). Da unspezifische Nukleasen jedoch meist nicht von großem Nutzen sind, wurde die Nuklease an eine neue DNA-Erkennungsdomäne fusioniert. So wurde die Nukleasedomäne von *FokI* an zwei verschiedene Zink-Finger-Proteine fusioniert. Jedes dieser Hybridproteine war in der Lage λ -Phagen-DNA an einer spezifischen Stelle zu schneiden (Kim *et al.*, 1996). Somit konnte gezeigt werden, dass die Nukleasedomäne von *FokI*, mit Hilfe einer entsprechenden DNA-Bindedomäne, an eine beliebige Sequenz dirigiert werden kann.

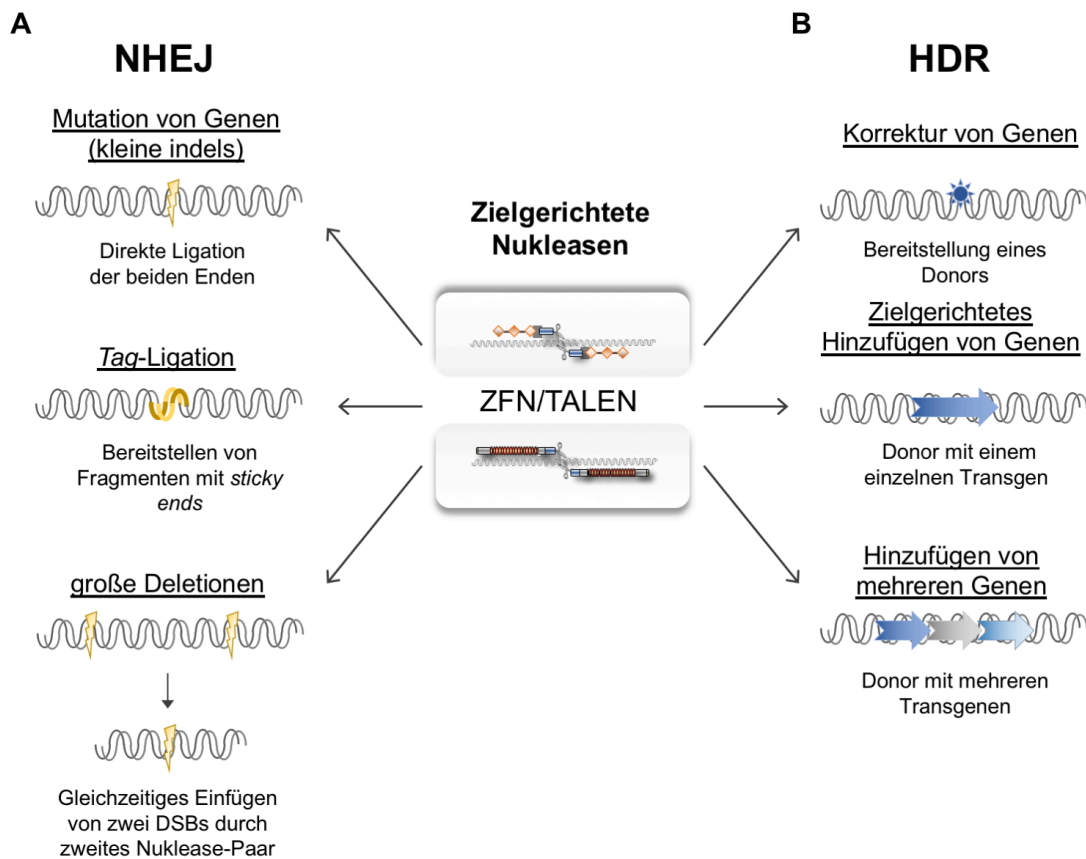


Abbildung 1.4.1 Übersicht über die Möglichkeiten des Genome Editing mit zielgerichteten Nukleasen. Ein durch Nukleasen eingefügter Doppelstrangbruch (DSB) der DNA kann entweder durch *non-homologous end joining* (NHEJ) oder durch *homology-directed repair* (HDR) von der Zelle repariert werden. **A)** Ist keine geeignete homologe Matrize (Donor) vorhanden, so werden die beiden Enden des DSBs einfach ligiert. Dadurch entstehen kleine Insertionen und Deletionen, welche so das Gen zerstören. Stellt man ein kleines DNA-Fragment mit *sticky ends* zur Verfügung, so kann dies an der Stelle des DSBs eingefügt werden (*Tag-Ligation*). Fügt man gleichzeitig zwei DSBs ein, so kann der dazwischenliegende DNA-Bereich deletiert werden. **B)** Steht eine homologe Matrize (Donor) zur Verfügung, z.B. ein homologes Chromosom oder ein Plasmid mit homologen Bereichen, kann ein fehlerhaftes Gen korrigiert werden. Stellt man ein Plasmid mit homologen Bereichen als Donor zur Verfügung, welches eines oder mehrere Transgene trägt, können Gene zum Genom des Ziel-Organismus hinzugefügt werden.

Nun konnten spezifische Nukleasen erstellt werden, indem man an einen Zink-Finger-Array, mit benutzerdefinierter DNA-Spezifität, die katalytische Domäne von *FokI* fusioniert (Abb. 1.4.2A). Das so entstehende Fusionsprotein wird als Zink-Finger-Nuklease (ZFN) bezeichnet (Kim *et al.*, 1996; Urnov *et al.*, 2010; Carroll, 2011). Für eine erfolgreiche Spaltung der DNA muss die *FokI*-Domäne, wie auch das natürliche *FokI*-Protein, dimerisieren (Bitinaite *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Carroll, 2014). Daher werden zwei ZFN mit je einem *FokI*-Monomer benötigt. Die beiden ZFN binden in gegensätzlicher Orientierung (*tail-to-tail*) an die DNA (Abb. 1.4.1A). Zur besseren Unterscheidung der Nukleasen werden sie als *forward* beziehungsweise *reverse* ZFN bezeichnet (Urnov *et al.*, 2010). Dabei bindet die *forward* ZFN an den kodierenden Strang (*forward*-Strang) und die *reverse* ZFN an den kodogenen Strang (*reverse*-Strang) der DNA. Die Nutzung als ZFN-Paar stellte sich als großer Vorteil heraus, denn eine ZFN alleine ist nicht aktiv. Nur wenn

beide ZFN an ihre Zielsequenz binden und die *FokI*-Monomere dimerisieren wird die DNA an der gewünschten Stelle gespalten. Dies verbessert die Spezifität des ZFN-Paares, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass der DSB nur an der gewünschten Stelle im Genom eingefügt wird, erhöht wird (Miller *et al.*, 2007). Für die Dimerisierung ist wichtig, dass die *forward* und *reverse* ZFN mit einem definierten Abstand zueinander an die DNA binden. Diesen Abstand zwischen den Zielsequenzen der *forward* und *reverse* Nuklease bezeichnet man als *Spacer*-Bereich. Der *Spacer*-Bereich gibt den *FokI*-Monomeren genug Platz um zu dimerisieren und die DNA zu schneiden (Smith *et al.*, 2000; Bibikova *et al.*, 2001; Urnov *et al.*, 2010).

Das natürliche *FokI*-Protein bildet Homodimere um die DNA zu spalten (Abb. 1.4.1B; Bitinaite *et al.*, 1998; Vanamee *et al.*, 2001). Dies kann beim Einsatz von ZFN unter Umständen zur unspezifischen Spaltung der DNA führen. Bindet eine der ZFN, an einen *inverted repeat* oder Ähnliches, kann es zur Ausbildung eines Homodimers kommen und die DNA wird an dieser ungewollten Stelle gespalten (Abb. 1.4.1B). Um die nicht gewünschten Spaltungen zu minimieren, wurden durch Mutationen neue *FokI*-Varianten erstellt, welche Mutationen in der Dimerisierungsdomäne aufweisen und nur Heterodimere ausbilden können (Szczepek *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2010; Urnov *et al.*, 2010; Abb. 1.4.1C). Beispiele für solche *FokI*-Varianten sind die obligaten Heterodimere DD/RR und KK/EL (Miller *et al.*, 2007; Szczepek *et al.*, 2007). Dabei befinden sich in der Dimerisierungs-Plattform einer Domäne einmal das Aminosäuremotiv DD oder KK und in der anderen Domäne RR oder EL (Abb. 1.4.2D). Jedoch verringerte sich die Effizienz der DNA Spaltung dieser Varianten im Vergleich zum Wildtyp deutlich. Um die Effizienz der heterodimerisierenden Varianten wieder zu erhöhen, wurden durch gezielte Evolution neue *FokI*-Derivate generiert (Guo *et al.*, 2010). Somit konnten die sogenannten *Sharkey* DS/RR *FokI*-Derivate identifiziert werden. Diese Derivate spalten die DNA effizienter als die heterodimerisierenden DD/RR, KK/EL oder die Wildtyp *FokI*-Varianten (Guo *et al.*, 2010). Bei den *Sharkey*-Varianten wurden zwei wichtige Mutationen identifiziert. An Position 418 wurde ein Serin zu Prolin und an Position 441 wurde ein Lysin zu Glutaminsäure geändert. Diese Aminosäureaustausche sorgen dafür, dass die DNA-Spaltungseffizienz erhöht wird (Guo *et al.*, 2010). Durch die Nutzung von heterodimerisierenden *FokI*-Varianten wird die Spaltung von DNA durch ZFN spezifischer. Somit sind ZFN eines der ersten spezifischen molekularen Werkzeuge um DSBs in Genome von Organismen einzufügen. So konnten mit Hilfe von ZFN z.B. in menschlichen Zellen, Zebrafisch, *Drosophila* und *Arabidopsis* verschiedene Gene mutiert werden (Bibikova *et al.*, 2002; Urnov *et al.*, 2005; Doyon *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010).

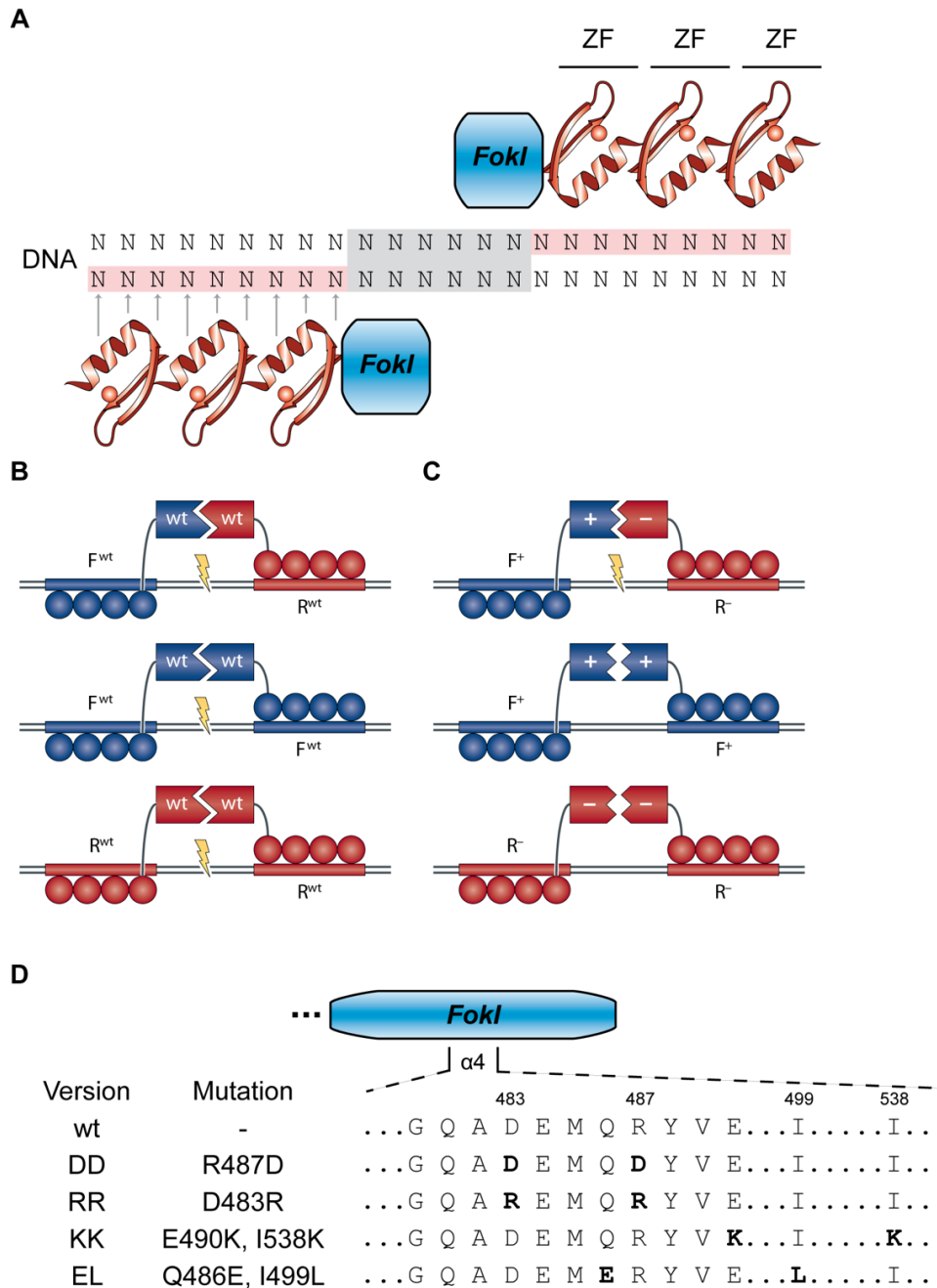


Abbildung 1.4.2 Design von ZFN und Dimerisierung von FokI-Varianten

A) Schematische Abbildung eines an DNA gebundenen ZFN-Paares. Jede ZFN enthält die FokI-Nukleasedomäne, welche an drei bis sechs ZFP fusioniert ist (drei sind hier dargestellt). Jedes ZFP bindet drei Basen der DNA (graue Pfeile). Die Zielsequenzen der ZFN (rot) werden von einem Spacer-Bereich (üblicherweise 5-6bp) getrennt. **B**) Schematische Abbildung von homodimerisierenden ZFN-Paaren, welche an DNA binden. Die forward und reverse ZFN binden an ihre Zielsequenz (oben) die Wildtyp FokI-Domänen dimerisieren und spalten die DNA. Es ist jedoch auch möglich, dass zwei forward oder reverse ZFN tail-to-tail an die DNA binden. Auch dann ist es möglich, dass die wtFokI-Domänen dimerisieren und die DNA spalten (Mitte und unten). **C**) Schematische Abbildung von heterodimerisierenden ZFN-Paaren, welche an DNA binden. Binden die forward und die reverse ZFN an ihre Zielsequenzen, dimerisieren die obligaten Heterodimer-FokI-Domänen und spalten die DNA (oben). Binden zwei forward oder reverse ZFN tail-to-tail an die DNA, können die FokI-Domänen nicht dimerisieren und somit wird die DNA nicht gespalten (Mitte und unten). **D**) Schematische Darstellung der FokI-Domäne. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der $\alpha 4$ -Helix (Positionen 480-490) zusammen mit den Positionen 499 und 538 für verschiedene FokI-Varianten. Zur Darstellung der Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code verwendet. Die Position der Mutationen ist links zu sehen. In fett sind die ausgetauschten Aminosäuren sowie die zwei anderen Aminosäuren abgebildet, welche den FokI-Varianten ihre Namen geben. wt – Wildtyp; F – forward ZFN; R – reverse ZFN; B und C verändert nach Urnov *et al.*, 2010.

Desweiteren konnten vor allem in menschlichen Zellen Gene hinzugefügt (*AAVS1*, *OCT4*, *CCR5*) oder repariert (*IL2RG*, *HBB*, *A1AT*) werden (Urnov *et al.*, 2005; Hockemeyer *et al.*, 2009; DeKolver *et al.*, 2010; Yusa *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Ein großer Nachteil der ZFN liegt jedoch darin, dass sich die einzelnen Zink-Finger in einem Array teilweise gegenseitig beeinflussen. Daher ist die resultierende Spezifität nicht immer vorhersehbar. Das heißt, ein ZFP, was ein bestimmtes Triplett bindet, kann in einem Array mit anderen ZFP eine leicht abweichende DNA-Spezifität haben (Ramirez *et al.*, 2008; Maeder *et al.*, 2008; Urnov *et al.*, 2010). Somit ist nicht immer garantiert, dass das neu erstellte Zink-Finger-Protein wirklich die gewünschte Sequenz bindet. Dadurch ist die Erstellung spezifischer ZFN nicht immer reproduzierbar und das Identifizieren geeigneter ZF-Kandidaten, welche spezifisch eine gewünschte Sequenz binden, ist sehr zeitaufwändig und schwierig (Maeder *et al.*, 2008; Urnov *et al.*, 2010). Für die Erstellung von zuverlässigeren hochspezifischen Genomscheren musste man die *FokI*-Nukleasedomäne an eine andere spezifische und leicht zu erstellende DNA-Bindedomäne fusionieren.

1.4.3 TALE-Nukleasen (TALEN)

Mit der Entschlüsselung des TALE-Codes war klar, dass die *repeats* eine universelle DNA-Bindedomäne sind, welche es erlaubt, jede beliebige Sequenz zu erkennen. Diese Entdeckung führte zu einer explosionsartigen Entwicklung von einer neuen programmierbaren DNA-Bindedomäne. So konnten nach kurzer Zeit Fusionsproteine aus einem TALE und der Nukleasedomäne von *FokI* erstellt werden (Christian *et al.*, 2010; Cermak *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011; Abb. 1.4.3). Diese Fusionsproteine bezeichnet man als TALE-Nukleasen (TALEN). Da TALEN aufgrund des TALEs, mit einer Proteingröße von ca. 3500bp (bei TALEs mit 17,5 *repeats*), relativ groß sind, wurden zunächst verschiedene Architekturen von TALEN getestet. So wurden unter anderem verschiedenen N- und C-terminale Verkürzungen von TALEs untersucht (Miller *et al.*, 2011; Mussolino *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass TALEs mit dem verkürzten N-terminalen Bereich $\Delta 152$ keine Beeinträchtigung bei der DNA-Bindung aufweisen (Szurek *et al.*, 2002) sowie Fusionen von TALEs mit C-terminalen Verkürzungen +28 und +63 an *FokI* effizient die DNA spalten können (Miller *et al.*, 2011). Durch Verwendung dieser Verkürzungen kann die Größe der TALEN um ca. 1200bp (N-terminale Region $\Delta 152$ und C-terminale Region+28) bzw. 1100bp (N-terminale Region $\Delta 152$ und C-terminale Region+63) reduziert werden. TALEN werden analog zu ZFN als Paar verwendet (Christian *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011; Carroll, 2014), wobei die linke und rechte TALEN in gegensätzlicher Orientierung an die DNA binden (Abb. 1.4.3). Im Gegensatz zu ZFN muss, bedingt durch die Größe der C-terminalen Region der TALEs,

bei TALEN der *Spacer*-Bereich größer sein. Ein *Spacer*-Bereich von 12-20bp zwischen den beiden Zielsequenzen der einzelnen TALEN, erwies sich als funktional (Miller *et al.*, 2011; Mussolino *et al.*, 2011). TALEN mit dem N-terminalen Bereich $\Delta 152$ und der C-terminalen Verkürzungen +63 ist die gebräuchlichste Architektur. Dafür wird idealerweise ein *Spacer*-Bereich von 15-16bp verwendet (Miller *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012; Ansai *et al.*, 2013). TALEN-Proteine werden mit Hilfe der selben Methoden hergestellt wie TALEs. Dabei wird die *FokI*-Nukleasedomäne als Modul erstellt und in der Reaktion an den entsprechenden TALE fusioniert.

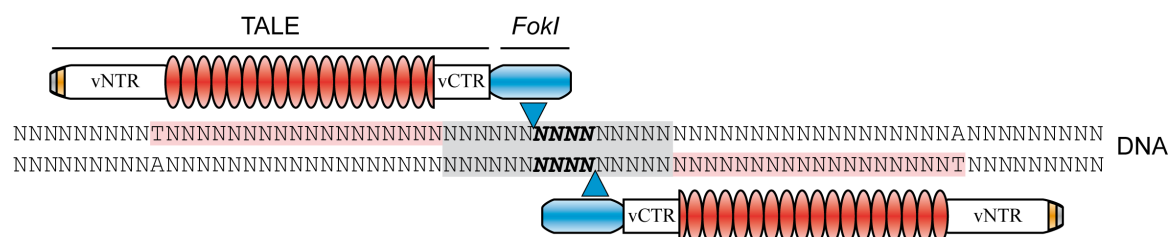


Abbildung 1.4.3 Schema von TALEN gebunden an DNA.

TALEN bestehen aus einem TALE, welcher als DNA-Bindedomäne fungiert, fusioniert an die *FokI*-Nukleasedomäne. Dabei sind die N-terminale und die C-terminale Region des TALEs verkürzt. TALEN werden als Paar verwendet, da die *FokI*-Nukleasedomäne dimerisieren muss, um die DNA zu spalten. Sie binden in einer *tail-to-tail* Orientierung an die DNA. Die Zielsequenzen der beiden TALEN (rot) werden dabei von einem *Spacer*-Bereich (grau) getrennt. Dieser *Spacer*-Bereich ist nötig, damit die *FokI*-Domäne dimerisieren kann. *FokI* spaltet die DNA versetzt und erzeugt somit einen 4bp Überhang (Fett, kursiv **N**). vNTR – verkürzte N-terminale Region; vCTR - verkürzte C-terminale Region.

Mit Hilfe von TALEN konnten bereits erfolgreich Mutationen in den humanen Genen *CCR5* (Miller *et al.*, 2011) *OCT4* oder *PITX4* (Hockemeyer *et al.*, 2011) eingefügt werden. Außerdem konnten auch in anderen Organismen, wie zum Beispiel Hefen (Christian *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011), *Drosophila* (Beumer *et al.*, 2013), Zebrafischen (Huang *et al.*, 2011; Sander *et al.*, 2011; Bedell *et al.*, 2012), Nematoden (Wood *et al.*, 2011), Maus (Wefers *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2013), und Schwein (Carlson *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2013), TALEN erfolgreich angewendet werden. Auch in Pflanzen wurden TALEN eingesetzt und getestet. Mahfouz *et al.* konnten TALEN als eine der ersten erfolgreich in *Nicotiana benthamiana* einsetzen und testen (Mahfouz *et al.*, 2011). Dafür wurden TALEN mit vollständigen natürlichem N- und C-Termini von Hax3 und 11,5 *repeats* erstellt. Zunächst wurden die TALEN *in vitro* getestet. Mit Hilfe eines EMSA wurden die TALEN auf DNA-Bindung untersucht und durch eine Restriktionsanalyse wurde die Fähigkeit der TALEN, DNA zu spalten, getestet (Mahfouz *et al.*, 2011). Der *in vivo* Test der Nukleasen erfolgte mittels transienter Expression der TALEN via *Agrobacterium tumefaciens* in *N. benthamiana*. Mit Hilfe eines GUS-Reporterassays konnte die Aktivität der TALEN in Blättern von *N. benthamiana* gezeigt werden (Mahfouz *et al.*, 2011). So wurde in dieser Studie die *in vitro*

und *in vivo* Aktivität von TALEN nachgewiesen. Weiterhin wurden mit Hilfe von TALEN auch in anderen Pflanzen Mutationen eingefügt. In *Arabidopsis* konnten z.B. die Gene *ADH1*, *MAPKKK1*, *GLL22a*, *GLL22b* und *CRU3* mutiert werden (Cermak *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2013; Christian *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse zeigen, dass TALEN potente molekularbiologische Werkzeuge sind und auch eingesetzt werden können, um Nutzpflanzen wie Reis, Mais, Sojabohne oder Kartoffel genetisch zu verändern und somit zu verbessern (Carroll, 2014; Malzahn *et al.*, 2017). Es ist vorstellbar, mit Hilfe von TALEN, bestimmte Eigenschaften der Nutzpflanzen zu verbessern oder sie resistent gegenüber Angriffen von Schädlingen zu machen.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Wirt-Pathogen-Interaktionen sind häufig ein Kampf ums Überleben der von beiden Seiten schnelle Anpassung und ständige Innovationen erfordert. Seit ihrer Entdeckung und Entschlüsselung des RVD-DNA-Codes sind TALEs Gegenstand intensiver Forschung. Vor allem die Interaktion zwischen *Xanthomonas* und Reis ist von großer Bedeutung. Durch *Xanthomonas* spp. kommt es in Asien immer wieder zu hohen Ernteeinbußen beim Reisanbau. Reispfadogene *Xanthomonas*-Spezies, wie *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) und *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*), besitzen bis zu 20 verschiedene TALEs pro Stamm. Dennoch sind nur für einige wenige bereits erfolgreich Ziel-Gene identifiziert worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten, zusammen mit Kooperationspartnern am CIRAD und IRD in Montpellier (Frankreich), Reispflanzen erstellt werden, welche resistent gegenüber Infektionen von *Xoo*-Stämmen sind. Dafür sollten spezifische TALEN genutzt werden, welche die Zielsequenzen von natürlichen TALEs im Promotor von Reis-Genen mutieren. Durch die Mutation der TALE-Zielsequenzen können diese nicht länger binden und die Transkription des Zielgens initiieren. Außerdem sollte versucht werden, die TALEN-Technologie zu vereinfachen, indem eine Ein-Protein-Lösung entwickelt werden sollte. Dies könnte die Arbeit mit TALEN vereinfachen, da es bei manchen Applikationen von Vorteil sein kann, nur ein Protein in den Ziel-Organismus zu bringen. Dafür sollte eine sogenannte *single-chain*-TALEN konstruiert und getestet werden, bei der zwei *FokI*-Monomere zusammen an eine TALE-DNA-Bindedomäne fusioniert werden.

Des Weiteren sollten neue Ziel-Gene von *Xoo* TALEs identifiziert werden, um einerseits den Beitrag der TALEs zur Virulenz des jeweiligen *Xoo*-Stammes besser verstehen zu können und um andererseits neue Ziele zu identifizieren und damit letztendlich resistente Reispflanzen zu erstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Plasmide

Tabelle 2.1 Verwendete Plasmide

Name	Vektor-Rückgrat	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pEGGwos	-	Golden-Gate-kompatibles pENTR/D-TOPO Derivat ohne Stop-Codon	Kanamycin	Diplomarbeit Tom Schreiber 2015
pEGGws	-	Golden-Gate-kompatibles pENTR/D-TOPO Derivat mit Stop-Codon	Kanamycin	Diplomarbeit Tom Schreiber 2015
pK7FWG2.0	-	empty vector - C-terminal GFP	Spectinomycin	Karimi <i>et al.</i> , 2005
pK7WGF2.0	-	empty vector - N-terminal GFP	Spectinomycin	Karimi <i>et al.</i> , 2005
pMGE500	-	pZmUbi1:Cas_hpt_ccdB	Kanamycin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE501	-	pUC M1	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE503	-	pUC M2	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE505	-	pUC M2E	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE507	-	pUC M4	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE508	-	pUC M4E	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE509	-	pUC M3	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE512	-	pUC M5	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE513	-	pUC M6	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE514	-	pUC M7	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE515	-	pUC M8E	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMGE516	-	pUC M1E	Ampicilin	Ordon <i>et al.</i> , 2017
pMR206	pUC57	Hax3 C63 Fok RR SHARKEY	Ampicilin	diese Arbeit
pMR209	pUC57	Hax3 C63 Fok DS SHARKEY	Ampicilin	diese Arbeit
pMR214	pEGGws	TALEN TCL.S	Kanamycin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR214	pK7WGF2.0	TALEN TCL.S	Spectinomycin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR214	pDest17	TALEN TCL.S	Ampicilin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR215	pEGGws	TALEN TCR.S	Kanamycin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR215	pK7WGF2.0	TALEN TCR.S	Spectinomycin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR215	pDest17	TALEN TCR.S	Ampicilin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR216	pEGGws	TALEN Ax7L.S	Kanamycin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR216	pK7WGF2.0	TALEN Ax7L.S	Spectinomycin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR216	pDest17	TALEN Ax7L.S	Ampicilin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR217	pEGGws	TALEN Ax7R.S	Kanamycin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR217	pK7WGF2.0	TALEN Ax7R.S	Spectinomycin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012

pMR217	pDest17	TALEN Ax7R.S	Ampicilin	Masterarbeit Maik Reschke, 2012
pMR218	pUC57	Repeatmodul 1 NS	Ampicilin	diese Arbeit
pMR219	pUC57	Repeatmodul 2 NS	Ampicilin	diese Arbeit
pMR220	pUC57	Repeatmodul 3 NS	Ampicilin	diese Arbeit
pMR221	pUC57	Repeatmodul 4 NS	Ampicilin	diese Arbeit
pMR222	pUC57	Repeatmodul 5 NS	Ampicilin	diese Arbeit
pMR223	pUC57	Repeatmodul 6 NS	Ampicilin	diese Arbeit
pMR240	pK7FWG2.0	scAx7L35	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR240	pDest17	scAx7L35	Ampicilin	diese Arbeit
pMR241	pK7FWG2.0	scAx7R35	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR241	pDest17	scAx7R35	Ampicilin	diese Arbeit
pMR242	pK7FWG2.0	scTCL35	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR243	pK7FWG2.0	scTCR35	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR246	pEGGws	singlechain Ax7L17 (17aa linker)	Kanamycin	diese Arbeit
pMR247	pEGGws	singlechain Ax7L30	Kanamycin	diese Arbeit
pMR248	pEGGws	singlechain Ax7L35	Kanamycin	diese Arbeit
pC2DSAx7	pC2300 UBI OE	Ax7L TALEN in pCambia2300. NTH3Δ151+Ax7L_R+C63+FokDSws	Kanamycin	diese Arbeit
pC5RRAx7	pC5300 UBI OE	Ax7R TALEN in pCambia5300. NTH3Δ151+Ax7R_R+C63+FokRRws	Kanamycin	diese Arbeit
pC2DSTC	pC2300 UBI OE	TalC L TALEN in pCambia2300. NTH3Δ151+TCL_R+C63+FokDSws	Kanamycin	diese Arbeit
pC5RRTC	pC5300 UBI OE	TalC R TALEN in pCambia5300. NTH3Δ151+TCR_R+C63+FokRRws	Kanamycin	diese Arbeit
pC2scLx7	pC2300 UBI OE	Ax7L35 scTALEN in pCambia2300. NTH3Δ151+Ax7L_R+C63+scFokws	Kanamycin	diese Arbeit
pC2scRax7	pC2300 UBI OE	Ax7R35 scTALEN in pCambia2300. NTH3Δ151+Ax7R_R+C63+scFokws	Kanamycin	diese Arbeit
pC2scLTC	pC2300 UBI OE	TCL35 scTALEN in pCambia2300. NTH3Δ151+TCL_R+C63+scFokws	Kanamycin	diese Arbeit
pC2scRTC	pC2300 UBI OE	TCR35 scTALEN in pCambia2300. NTH3Δ151+TCR_R+C63+scFokws	Kanamycin	diese Arbeit
pC5300 UBI OE	-	Gateway-kompatibles pCAMBIA-Derivat	Kanamycin	E. Guiderdoni, IRD Montpellier
pC2300 UBI OE	-	Gateway-kompatibles pCAMBIA-Derivat	Kanamycin	E. Guiderdoni, IRD Montpellier
pMRR06	pGWB2	Gus-Reporter Ax7LR	Kanamycin	diese Arbeit
CasVNp3	-	V.Nekrasov - p3 (14.5.3-1)	Spectinomycin	V. Nekrasov
CasVNp2	-	V.Nekrasov - p2 (14.5.2-1)	Spectinomycin	V. Nekrasov
CasVNp1	-	V.Nekrasov - p1 (14.5.1-2)	Spectinomycin	V. Nekrasov
CasVN	-	V.Nekrasov - Cas9	Spectinomycin	V. Nekrasov
pMR500	pSKA2	scPDS11	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR501	pSKA2	scPDS10	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR502	pSKA2	scPDS13	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR503	pSKA2	scPDS15	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR504	pSKA2	scPDS14	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR505	pSKA2	scPDS12	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR506	pSKA2	PDS4	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR507	pSKA2	PDS5	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR508	pSKA2	PDS6	Spectinomycin	diese Arbeit

pMR509	pSKA2	PDS7	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR510	pSKA2	scPDS4	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR511	pSKA2	scPDS5	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR512	pSKA2	scPDS6	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR513	pSKA2	scPDS7	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR514	pSKA2	guusRep-Os11N3	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR515	pSKA2	guusRep-Ax7	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR516	pSKA2	artTalaQ	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR517	pSKA2	artTalaO	Spectinomycin	diese Arbeit
pMR518	pSKA2	artTalaCA	Spectinomycin	diese Arbeit
MR-49LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-49AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-49BR	AV B-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-50LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-50AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-50BC	AV-B-C	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-50CR	AV C-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-51LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-51AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-51BC	AV-B-C	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-51CR	AV C-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-52LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit

MR-52AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-52BC	AV-B-C	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-52CR	AV C-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-53LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-53AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-53BC	AV-B-C	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-53CR	AV C-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-54LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-54AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-54BC	AV-B-C	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-54CR	AV C-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-55LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-55AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-55BR	AV B-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-56LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-56AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit

MR-56BR	AV B-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-57LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-57AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-57BR	AV B-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-58LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-58AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-58BC	AV-B-C	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-58CR	AV C-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-59LA	AV L-A	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-59AB	AV A-B	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-59BRa	AV B-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
MR-59BRb	AV B-R	Hexa-Repeat-Modul Nachbau der natürlichen TALEs Siehe Anhang 1	Kanamycin	diese Arbeit
pSKX1	-	Expressionsvektor für Xanthomonas	Gentamycin	Sabine Thieme
pSKA2	-	Expressionsvektor für Agrobacterium	Spectinomycin	Sabine Thieme
pMR-AB2	pSKX1	TALE AB2	Gentamycin	diese Arbeit
pMR-AG2	pSKX1	TALE AG2	Gentamycin	diese Arbeit
pMR-AT1A	pSKX1	TALE AT1-A	Gentamycin	diese Arbeit
pMR-AT1B	pSKX1	TALE AT1-B	Gentamycin	diese Arbeit
pCTAOwos	pUC57	CTAOwos	Ampicilin	diese Arbeit
pNTAG	pUC57	NTAG	Ampicilin	diese Arbeit
pMR400	pSKX1	artTalAB	Gentamycin	diese Arbeit
pMR401	pSKX1	artTalAA	Gentamycin	diese Arbeit
pMR402	pSKX1	artTalAN	Gentamycin	diese Arbeit
pMR403	pSKX1	artTalAH	Gentamycin	diese Arbeit

pMR404	pSKX1	artTalAG	Gentamycin	diese Arbeit
pMR405	pSKX1	artTalAF	Gentamycin	diese Arbeit
pMR406	pSKX1	artTalBA	Gentamycin	diese Arbeit
pMR407	pSKX1	artTalBX	Gentamycin	diese Arbeit
pMR408	pSKX1	artTalBM	Gentamycin	diese Arbeit
pMR409	pSKX1	artTalAT-A	Gentamycin	diese Arbeit
pMR410	pSKX1	artTalAT-B	Gentamycin	diese Arbeit
pMR411	pSKX1	artTalCA	Gentamycin	diese Arbeit
pMR412	pSKX1	artTalAO	Gentamycin	diese Arbeit
pMR413	pSKX1	artTalaQ	diese Arbeit	diese Arbeit
pMR414	pSKX1	artTalaP	diese Arbeit	diese Arbeit
MR70LA	AV L-A	scPDS6LA	Kanamycin	diese Arbeit
MR71LA	AV A-B	scPDS6AB	Kanamycin	diese Arbeit
MR72BR	AV B-R	scPDS6BR	Kanamycin	diese Arbeit
MR73LA	AV L-A	scPDS7LA	Kanamycin	diese Arbeit
MR74AB	AV A-B	scPDS7AB	Kanamycin	diese Arbeit
MR75BR	AV B-R	scPDS7BR	Kanamycin	diese Arbeit
pMRN80	pMGE501	sg2g1	Ampicilin	diese Arbeit
pMRN81	pMGE503	sgAP1	Ampicilin	diese Arbeit
pMRN82	pMGE509	sgAQ1	Ampicilin	diese Arbeit
pMRN83	pMGE507	sgAR1	Ampicilin	diese Arbeit
pMRN84	pMGE512	sgAx71	Ampicilin	diese Arbeit
pMRN85	pMGE513	sgBM1	Ampicilin	diese Arbeit
pMRN86	pMGE514	sgBX1	Ampicilin	diese Arbeit
pMRN87	pMGE515	sgTC1	Ampicilin	diese Arbeit

2.1.2 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.2 aufgelistet und wurden durch die Firma Metabion GmbH (Martinsried) oder Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 2.2 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
AG4_N_2016_F	CGAGCGTGGCGCGCGGTGACACA	Klonierung N-term.-Domäne, TalAG4,
Hax-3N-F	TTGTTGCCAGTTATCTC	Klonierung N-term.-Domäne, TalAG4,
Hax-3N-R	AGGGGGGCACCCGTCAG	Klonierung N-term.-Domäne, TalAG4,
GGC_Module_R/MR	CCTCTTCGCTATTACGCCAG	Sequenzieren von einzel Repeat-Modulen - pUC57
GGC_Module_F/MR	GTTAGCTCACTCATTAGGCAC	Sequenzieren von einzel Repeat-Modulen - pUC57
M13_F	GTA AACGACGGCCAG	Sequenzieren von TALE-Konstrukten
M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzieren von TALE-Konstrukten
Hax-34C_F	TTTGGTCTCAAGCATTGTTGCCAGTTATCTC	Klonierung C-term.-Domäne, TalAO
pCTAO_R	TTTGGTCTCTAAGCTTCAGATCGTCCCTCCGACTGAG	Klonierung C-term.-Domäne, TalAO
pCTAOwos_R	TTTGGTCTCTCACCGATCGTCCCTCCGACTGAG	Klonierung C-term.-Domäne, TalAO
PDS_seqR5	TTTAAAGGATTAAGTCCTTTGTCA	Amplifikation RFLP-Fragment von NbPDS
PDS_MlyI_F	GCTTTGCTTGAGAAAAGCTCTC	Amplifikation RFLP-Fragment von NbPDS
Os01g20160_F1	GTCGGCCGTCGTCGTGCTCT	Primer für qRT-PCR
Os01g20160_F2	ACGTGGTGATGATGTACCTGCCACC	Primer für qRT-PCR
Os01g20160_F3	GGGCAGGAGGGCAGCAGCAG	Primer für qRT-PCR
Os01g20160_R1	CTGTACCCCGTGCTGAACCCCA	Primer für qRT-PCR
Os01g20160_R2	GCCTCACCTGCCTCGCGC	Primer für qRT-PCR
Os01g20160_R3	GACGGCCATGAGAGTGAGCTTCCC	Primer für qRT-PCR
Os01g52020_F1	CACCGTCCTTCCACTGCGCG	Primer für qRT-PCR
Os01g52020_F2	GAGACGGGCGGATGCGAGCG	Primer für qRT-PCR
Os01g52020_F3	GGTTGAGGGAGATTTGGTGGGGCTGA	Primer für qRT-PCR
Os01g52020_R1	CCACCGCCGTGAGCTTGCC	Primer für qRT-PCR
Os01g52020_R2	GACGTCGCCGCGAGCTCCG	Primer für qRT-PCR
Os01g52020_R3	TTACCACCGTCGCCGTCGCC	Primer für qRT-PCR
Os01g7350_F1	ATCTCCATGACCTTCTCTCCCTCTCCAA	Primer für qRT-PCR
Os01g7350_F2	GTACAGCTCCGAGATCTCCCGCTCCA	Primer für qRT-PCR
Os01g7350_R1	AATAATTTGCATGATGGCTGCTAGTGCC	Primer für qRT-PCR
Os01g7350_R2	GCAAATAATTTGCATGATGGCTGCTAGTGCC	Primer für qRT-PCR
Os01g73890_F1	ATGGCCACCTTCGAGCTGTACCG	Primer für qRT-PCR
Os01g73890_F2	CGGAGGTCCACCATCGGTATGTGC	Primer für qRT-PCR
Os01g73890_R1	ATCGCAGGCCACGATCTTCACCT	Primer für qRT-PCR
Os01g73890_R2	AGTCTCCAGCAATTTGGAATCGCAGG	Primer für qRT-PCR

Os02g06670_F1	TGCCTGCTTTGCTCTTGTTGGT	Primer für qRT-PCR
Os02g06670_F2	CTCAGCTCAAGGTCGGCGGC	Primer für qRT-PCR
Os02g06670_R1	ACGCCGCTGATGAAGAAGAAGGC	Primer für qRT-PCR
Os02g06670_R2	GACGATGAGCTTCTCGCCGGC	Primer für qRT-PCR
Os03g04220_F1	AGGTTGCCCGCGTGCTCATG	Primer für qRT-PCR
Os03g04220_F2	CAGCTCGTCCGTGTCGACGC	Primer für qRT-PCR
Os03g04220_F3	TCTCAAGCTTCAGCCGCTCGG	Primer für qRT-PCR
Os03g04220_R1	CGCTGGGCACGTCGAAGCTC	Primer für qRT-PCR
Os03g04220_R2	CTTGGGCATGTTGGGCGGCA	Primer für qRT-PCR
Os03g04220_R3	CCATTGCTGTTGCCGTAGCCGT	Primer für qRT-PCR
Os03g55530_F1	AGCGGGAGTGCGAGGTGGG	Primer für qRT-PCR
Os03g55530_F2	CTACCTCATGCTGGTAGCGGAGACA	Primer für qRT-PCR
Os03g55530_R1	CCACCCCTTCCTCCGGTAA	Primer für qRT-PCR
Os03g55530_R2	GCGCACCGACGCCTCGTTG	Primer für qRT-PCR
Os04g05050_F1	GCTTCTCACCGGCACCGTCG	Primer für qRT-PCR
Os04g05050_F2	GTCGGCGGCGATGACGGTG	Primer für qRT-PCR
Os04g05050_F3	CTCTCCAACGCGCCGACGG	Primer für qRT-PCR
Os04g05050_R1	CCCAGCTTCTCCTCGCCGT	Primer für qRT-PCR
Os04g05050_R2	CCGGAGCGTGCCCTTCTTGG	Primer für qRT-PCR
Os04g05050_R3	GCGGTTGCCCTGGCTGTTGA	Primer für qRT-PCR
Os04g08280_F1	AGGGTGCAGATTATTCCGGCCA	Primer für qRT-PCR
Os04g08280_F2	TTCTTCAGCTCCTCTTAGAGCTCTTGGC	Primer für qRT-PCR
Os04g08280_R1	GTCGCCGGAGCCGACGTC	Primer für qRT-PCR
Os04g08280_R2	TGATCTCGGCGAGCGTGACCG	Primer für qRT-PCR
Os04g132260_F1	TCAAGTTCCTATCGCGCCTCCGT	Primer für qRT-PCR
Os04g43560_F2	AGTTCCCGACGTGGCGAAG	Primer für qRT-PCR
Os04g132260_F2	CCGTCCATTACAAGGTAACGGCATCA	Primer für qRT-PCR
Os04g43560_F3	TCGTCCGATGCGGAAGACG	Primer für qRT-PCR
Os04g43560_R1	CGTCTCCGCATGCCGACGA	Primer für qRT-PCR
Os04g132260_R1	GAGGTGAGGAAAGGGAGTCTGGGA	Primer für qRT-PCR
Os04g43560_R2	ACACCCTGCAAAGCACCCAATCC	Primer für qRT-PCR
Os04g132260_R2	AGAGTTCGGGGTATATAGAGGTGAGGA	Primer für qRT-PCR
Os04g43560_R3	CGTTCGCTCGGCGCGAAT	Primer für qRT-PCR
Os04g43560_F1	AGGTTCTACCCGAGCGACGAGG	Primer für qRT-PCR
Os05g14370_F1	CTGCTCTGAATTCTCGCTACGTCGG	Primer für qRT-PCR
Os05g14370_F2	TCGTGACAAAAGGAGGGCGA	Primer für qRT-PCR
Os05g14370_F3	AATCACAGCTGTTCCACATTATGACGG	Primer für qRT-PCR
Os05g14370_R1	TGGTTGCTTTGCAGTTTTGTTTCATGC	Primer für qRT-PCR
Os05g14370_R2	CCACGGGTACATGATGGTTTCGCC	Primer für qRT-PCR
Os05g14370_R3	AATCGCCAAGATCATCAGAGCAGCA	Primer für qRT-PCR
Os05g14440_F1	TGTTCTTGTGCTCACGAAACAACCT	Primer für qRT-PCR
Os05g14440_F2	CCCTTATCCAAGATCCGCATGCTTCG	Primer für qRT-PCR
Os05g14440_R1	GCCACTCTCAATTTACCCAACCTTCA	Primer für qRT-PCR
Os05g14440_R2	TGCATTACAAATATCTTGCTCCCTCCT	Primer für qRT-PCR
Os05g26032_F1	ATGCCCCAACCCCTGGCTCT	Primer für qRT-PCR
Os05g26032_F2	CCCTGGCTCTCTCCGCGCG	Primer für qRT-PCR
Os05g26032_F3	CGCAAGGTAGCAGCTATCATGTCATC	Primer für qRT-PCR
Os05g26032_R1	GTGTACAATTGGAGGCCTGCTTCGA	Primer für qRT-PCR

Os05g26032_R2	TTGGAGAGGAGTGTACAATTGGAGGCC	Primer für qRT-PCR
Os05g26032_R3	ACCAGCCAGAGACCTTGGAGAG	Primer für qRT-PCR
Os05g40110_F1	GCACGGGGAGCAGGGAGGAA	Primer für qRT-PCR
Os05g40110_F2	TTGGTTGCTTCAATTGGTTGCTGTGT	Primer für qRT-PCR
Os05g40110_F3	AAAAGGCAGAGTTCATGACTGAGATGC	Primer für qRT-PCR
Os05g40110_R1	ACTTGAAGGCTATAGAAACCATGCCCT	Primer für qRT-PCR
Os05g40110_R2	TCATCACCACCATCATCATCAGGGGG	Primer für qRT-PCR
Os05g40110_R3	GTTCTTCTTCTGGGTAAGCATCTCGGC	Primer für qRT-PCR
Os02g40410_F1	GCCAGCTATGGGTCAAACCTCAAGGA	Primer für qRT-PCR
Os02g40410_F2	GCGGACAGAAAACCTGCACCT	Primer für qRT-PCR
Os02g40410_F3	CATTGGATTGTCGAAGTGGAAACCTGA	Primer für qRT-PCR
Os02g40410_R1	TCCTGAAACCACTTTTGGCCCTGG	Primer für qRT-PCR
Os02g40410_R2	TGGGTGGATATCTTGTTGTCGTTGACT	Primer für qRT-PCR
Os02g40410_R3	TGCACAAGAACATGGCATTCCGA	Primer für qRT-PCR
Os03g03034_F1	CGGCAGACCACGACGCTG	Primer für qRT-PCR
Os03g03034_F2	CGACGTGCTCTCCGACGCCT	Primer für qRT-PCR
Os03g03034_F3	CACGGCTTCTCCAGGTGCTCA	Primer für qRT-PCR
Os03g03034_R1	GGCGGATCTTCTTGGCCGGG	Primer für qRT-PCR
Os03g03034_R2	TGGAGGCGGAGGTAGTCGCG	Primer für qRT-PCR
Os03g03034_R3	TTCTGTCTTCTGTGATACCAGCACT	Primer für qRT-PCR
Os06g29790_F1	TGGGTCATGAGGCTGCCGTT	Primer für qRT-PCR
Os06g29790_F2	GTCGTCGCCGAGCAGCAGC	Primer für qRT-PCR
Os06g29790_F3	TCCTCCACGGAGATCAGTCCCT	Primer für qRT-PCR
Os06g29790_R1	GCCGAGGATCTGCAGCTGGC	Primer für qRT-PCR
Os06g29790_R2	GAGCGTCGCTCTCGGCCTGG	Primer für qRT-PCR
Os06g29790_R3	ACAGAAGCTCACGGATGGCGG	Primer für qRT-PCR
Aktin neu RT F/JS	TGTGTGTGACAATGGAACCTGGC	Primer für qRT-PCR
Aktin neu RT 1 R/JS	GAGTCCAACACGATAACCAGTTG	Primer für qRT-PCR
11N3 alternativ F2/JS	CTACCTGGCCCCACTGC	Primer für qRT-PCR
11N3 alternativ R/JS	GTGCGCACCACCAGCC	Primer für qRT-PCR
Os8N3 RT Chu F/JS	AGTCGACGGGAGGGTACAG	Primer für qRT-PCR
Os8N3 RT R/JS	TTCGGGTACATGACGTAGGG	Primer für qRT-PCR
03g22590 neu F2/JS	CATTGGTCTTTGCTGTGGGG	Primer für qRT-PCR
03g22590 neu R/JS	CGGTGGTGGCCTTGAC	Primer für qRT-PCR
Xa25 F ATG/JS	GGCCTGTCCCTCGCAGCATC	Primer für qRT-PCR
Xa25 R ATG/JS	CCCGAACACCCCCAGTTC	Primer für qRT-PCR
02g30910 F neu/JS	TGTCCATGGAACGCAGCAC	Primer für qRT-PCR
02g30910 R neu/JS	CAGCCGAGGACGTGGAC	Primer für qRT-PCR
Bs4Pr-GG_R/AR	TTTGGTCTCACCTTAGATTCGATTA AAAATAAATTGTATG	Klonierung GUS-Reporter
AvrXa10-41	CACCTATATAAACACATAAAATTTCTTTCTTGATATAA ACTTTGTCC	Klonierung GUS-Reporter
AvrXa10-38	CACCTATATAAGCACATCAATTTCTTTCTTGATATAA ACTTTGTCC	Klonierung GUS-Reporter
AvrXa10-6	CACCTATATAAGCACGTAGCATTCTTTCTTGATATAA ACTTTGTCC	Klonierung GUS-Reporter
AvrXa10-98	CACCTAAACAAGCACACATCCTTCTTTCTTGATATAA ACTTTGTCC	Klonierung GUS-Reporter
Assembly seq R	GCTCACATGTTCTTCTCTGC	Sequenzieren von TALE-Konstrukten
seq rep rev	GGGCGAGATAACTGGGCAAC	Sequenzieren von TALE-Konstrukten
scFok-A-R	TTTGGTCTCATACCGCTGCCACCGCCACCGCTGCCACCGCCACCGCTGCCACCGCCA CCCGAGCTAGATCTGAAGTTGATCTCGC	Erstellung scFok-Golden Gate-Modul
scFok-B-F	TTTGGTCTCAGGTAGCTCGGGTGGCGGTGGCAGCGGTGGCGGTGGCAGCGGTG GCGGTGGCAGCCAGCTGGTGAAGAGCGAGCTG	Erstellung scFok-Golden Gate-Modul
scFok-B-R	GATCTTGAAGCTTTGAGACAAA	Erstellung scFok-Golden Gate-Modul

2.1.3 Verwendete Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die Bakterienstämme *E. coli* OneShot® Top10 (Invitrogen, Groningen) zur Vermehrung von Plasmiden und *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 (Larebeke *et al.*, 1974) zur transienten Expression in *N. benthamiana* verwendet. Außerdem wurden die *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Stämme PXO99A, PXO35, PXO83, PXO142, ICMP3125 und Roth1-8r verwendet.

Tabelle 2.3 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp/Eigenschaften
<i>E. coli</i> OneShot Top10	F- <i>mcrA</i> _(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lac</i> Z_M15_ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> _(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	C58, RifampicinR; Ti-Plasmid: pMP90 (pTIC58_T-DNA) GentamycinR, Gene für Nopalinsynthese

2.1.4 Verwendetes Pflanzenmaterial

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden *Nicotiana benthamiana* Tabakpflanzen verwendet. Die Anzucht der Pflanzen erfolgt im Gewächshaus, bei 26-28°C, und einer relativen Luftfeuchte von 65% sowie einer 16-stündigen Lichtperiode.

Für die Analyse der Interaktion von *Xoo* und Reis wurden die *Oryza sativa* subsp. *Japonica* cv. Nipponbare und Kitaake verwendet. Die Kultivierung von Nipponbare und Kitaake im Gewächshaus erfolgte tagsüber bei 25-28 °C (16 Stunden Licht) und nachts bei 22-24 °C, bei einer Luftfeuchtigkeit von 65 %. Als Substrat wurde eine Mischung aus Rhododendronerde und Blumenerde (Verhältnis 1:1) verwendet.

2.1.5 Verwendetes Medien und deren Zusammensetzung

Tabelle 2.4 Verwendete Medien und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
LB Medium (<i>lysogeny broth</i>)	1% (w/v) Bakto-Trypton 0,5% (w/v) Hefe Extrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,5	Anzucht von <i>E. coli</i>

YEB Medium (<i>yeast extract broth</i>)	0,5% (w/v) Bakto-Fleisch-Extrakt 0,1%(w/v) Bakto-Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) Bakto-Pepton 0,5% (w/v) Saccharose 0,2% 1 M MgSO ₄ pH 7,2	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>
AIM (<i>Agrobacterium</i> Infiltrations-Medium)	10 mM MES; pH 5,4 10 mM MgCl ₂ 150 µM Acetosyringon	Inokulation von <i>A. tumefaciens</i>
PSA Medium (<i>peptone saccharose</i> <i>agar</i>)	1% (w/v) Pepton 1% (w/v) Saccharose 0,1% (w/v) Glutaminsäure	Anzucht von <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>

Zur Herstellung von Nährmedie-Platten wurde dem jeweiligen Flüssigmedium 1,5% (w/v) Bacto-Agar hinzugefügt. Zur selektiven Kultivierung der Bakterienstämme wurden die autoklavierten Medien mit Antibiotika (Tab. 2.5) versetzt.

Tabelle 2.5 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicilin - Amp	100 µg/ml (feste Medien) 50 µg/ml (flüssige Medien)
Kanamycin - Kan	100 µg/ml (<i>A. tumefaciens</i>) 25 µg/ml (<i>E. coli</i>)
Spectinomycin - Spec	30 µg/ml
Hygromycin - Hyg	50 µg/ml
Rifampicin - Rif	100 µg/ml

Die Lagerung der Nährmedien-Platten und Flüssigmedien erfolgte bei 4°C. Zur dauerhaften Aufbewahrung der erstellten Bakterienstämme bei -80°C, wurde den Bakteriensuspensionen 7% Dimethylsulfoxid (DMSO) oder 10% Glycerol zugefügt.

2.1.6 Verwendete Lösungen und Puffer

Tabelle 2.6 Verwendete Lösungen/Puffer und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
<i>Puffer für DNA-Analysen</i>	
10x PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,5 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 1 % (v/v) Triton X100 0,1 % (w/v) Gelatine
1x TAE	40 mM Tris-Acetat, pH 8,0 1 mM EDTA
5x DNA Ladepuffer	15 % Ficoll 400 Farbstoff: Orange G
<i>Puffer für Proteinanalysen</i>	
4x Lämmli	240 mM Tris-HCl, pH 6,8 40 % (v/v) Glycerin 08 % (w/v) SDS 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
1x Tank	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
1x TBST	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween20
Towbin-Puffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 20% Methanol 0,04% (w/v) SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl; pH 6,8 0,005% (w/v) Bromphenolblau
Coomassie Färbelösung	0,2 % Coomassie R250 0,05 % Coomassie G250 42 % Ethanol 5 % Methanol 10 % Eisessig
Detektionslösung (ECL)	100 mM Tris-HCl, pH 8,5 225 nM p-Cumarinsäure 1,25 mM 3-Aminophtalhydrazid 0,3 % (v/v) H ₂ O ₂
<i>Puffer für in vivo TALEN Aktivitätstest</i>	
GUS-Extraktionspuffer	50 mM Natriumphosphat pH 7,0 10 mM EDTA pH 8,0 0,1 % SDS 0,1 % Triton X-100 10 mM β-Mercaptoethanol
GUS-Färbelösung	10 mM Natriumphosphat pH 7,0 10 mM EDTA pH 8,0 1 mM Kalium-ferricyanat 1 mM Kalium-ferrocyanat 0,1 % Triton X-100 0,1 % X-Gluc

2.2 Methoden

2.2.1 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook & Russell, 2001) mittels QIAprep Spin Miniprep Kit oder QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl oder 100 µl (Qiagen Plasmid Plus Midi Kit) bidestilliertem Wasser.

2.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die PCR (*polymerase chain reaction*, Saiki *et al.*, 1988), um DNA-Fragmente für Klonierungszwecken zu amplifizieren, erfolgte mit Hilfe der Phusion-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Vantaa) nach Angaben des Herstellers. Aufgrund einer Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) dieser Polymerase wird eine geringe Fehlerrate bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten gewährleistet. Die Dauer der Elongationszeit (30s pro 1kb), Anzahl der Zyklen sowie die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide (*Primer*), wurde je nach Reaktionsansatz angepasst. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Temperaturzyklus-Steuergerät (PTC-225Peltier Thermal Cycler, MJ Research FlexCycler, Analytik Jena) mit Heizdeckel durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.2.1 Standard PCR-Reaktion

Ein 50 µl Standard-PCR Ansatz (1 pg-100 ng DNA-Matrize; 1 x PCR-Puffer bzw. 1 x HF-Puffer; 0,25 mM Desoxyribonukleotide; 0,5 µM Oligonukleotid 1; 0,5 µM Oligonukleotid 2; 1 U Polymerase) wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung der DNA 95°C 1min

Denaturierung der DNA 95°C 15sek

Anlagerung der Oligonukleotide 50-70°C 30sek 30-35 Zyklen

Elongation (DNA Synthese) 72°C 15sek

Elongation (DNA Synthese) 72°C 5min

04°C

2.2.3 Mutagenese mittels SOE-PCR

Das Einfügen der *Sharkey* Mutationen, in die obligaten Heterodimeren *FokI* Derivate DD/RR, erfolgte mit Hilfe der SOE-PCR.

Die SOE (*spliced-overlap-extension*) PCR dient zur Fusion zweier DNA-Fragmente, die in ca. 20-30bp überlappen (Warrens *et al.*, 1997). Dazu werden zunächst die zwei überlappenden DNA-Fragmente in einer ersten PCR-Reaktion amplifiziert. In einer anschließenden zweiten PCR-Reaktion werden diese Fragmente zusammengefügt. Bei dieser Reaktion werden die beiden äußeren *Primer* und die beiden Fragmente eingesetzt. Dabei stellt der überlappende Bereich einen *Primer*-ähnlichen Polymerasestartpunkt dar. Ab dem zweiten Zyklus entsteht so ein Fusionsprodukt der beiden DNA-Fragmente, das nun durch die beiden außen liegenden Primer amplifiziert wird.

Für die Mutagenese der *FokI* Derivate wurden im ersten Schritt die Mutationen eingefügt. Anschließend wurden die PCR-Produkte gereinigt und im zweiten Schritt zusammengefügt.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Auftrennen von DNA-Fragmenten wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. In den meisten Fällen wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration von 0,8% - 2% genutzt. Die Agaroselösung (400ml) wurde mit 12µl, einer 10mg/ml Stammlösung, Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkten; Restriktionsfragmenten) wurde als Längenstandard der GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas GmbH; St. Leon Rot) verwendet.

2.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Fragment der gewünschten Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die anschließende Elution erfolgte mit Hilfe des GeneJET™ Gel Extraction Kits (Fermentas GmbH; St. Leon Rot).

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Reaktionsgemischen erfolgte mit Hilfe des GeneJET™ PCR Purification Kits (Fermentas GmbH; St. Leon Rot). Die eluierten bzw. gereinigten DNA-Fragmente wurden in 20µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

2.2.6 Restriktionsanalysen

Zur sequenzspezifischen Spaltung von isolierten und amplifizierten DNA-Fragmenten wurden kommerzielle Restriktionsendonukleasen verwendet. Die Wahl der Pufferbedingungen, Reaktionstemperaturen, Reaktionszeit und Enzymkonzentration erfolgte nach Herstellerangaben (Fermentas GmbH, St. Leon Rot bzw. New England Biolabs; Schwalbach/Taunus). In der Regel wurden 200-1000ng DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt und gespalten. Die Analyse der Restriktionsspaltung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.7 Gerichtete Ligation in pENTR/D-TOPO

Um ein PCR-Produkt gerichtet in den Vektor pENTR/D-TOPO zu klonieren, wurden *Primer* generiert, die dem gewünschten PCR-Produkt einen 5'-Überhang (CACC) hinzufügen. Dieser 5'-Überhang ist komplementär zum 3'-Überhang des linearisierten pENTR/D-TOPO. Mit Hilfe der, an den Vektor angehängten, Topoisomerase kann das PCR-Produkt

gerichtet in den Vektor ligiert werden. Dabei ist zu beachten, dass das 5'-Ende des Vektors mit glatten Enden (*blunt ends*) vorliegt. Dadurch wird die Verwendung einer DNA-Polymerase, ohne terminale Transferase Aktivität, erforderlich. Die in dieser Arbeit verwendete Polymerase ist die Phusion-Polymerase. Weiterhin enthält der pENTR/D-TOPO *attL* Rekombinationsstellen, welche die rekombinationsbasierte Klonierung der ligierten Fragmente mittels GATEWAY-Klonierung ermöglicht.

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurde folgender Reaktionsansatz genutzt:

4,5µl PCR-Produkt

0,5µl pENTR/D-TOPO

1µl 1:4 verdünnte Salzlösung

Die Reaktion wurde ca. 30min bei Raumtemperatur (ca. 25°C) inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz in chemisch kompetente *E. coli* (Top10) Zellen transformiert.

2.2.8 Rekombinationsbasierte Klonierung mittels GATEWAY

Die GATEWAY-Klonierung (Invitrogen) ermöglicht eine schnelle und gerichtete Klonierung von DNA-Fragmenten, unabhängig von Restriktionsschnittstellen und basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ .

Im GATEWAY-System werden modifizierte *attachment sites* (*att sites*; homologe DNA Sequenzen) genutzt, um einen gerichteten Austausch von DNA-Fragmenten zwischen einem Donor und Akzeptor (Zielvektor) durchzuführen. Dafür werden die Enzyme BP- oder LR-Klonase genutzt.

LR-Rekombination

Für die LR-Rekombination wurde ein Donorvektor (*Entry*-Vektor: pENTR/D-TOPO; pEGGws; pEGGwos) mit den zu klonierenden Fragmenten erstellt. Dabei werden die gewünschten Fragmente gerichtet zwischen die *attL1* und *attL2* Sequenzen ligiert. Als Zielvektoren dienten vor allem Expressionsvektoren wie z.B. PC2300OE, pC5300OE, pGWB2 oder pK7WGF2.0. Diese Vektoren enthalten ein *ccdB* Gen, welches von den *attR1* und *attR2* Sequenzen flankiert wird. Nach Reaktion mit der LR-Klonase II werden die DNA-Fragmente zwischen den *att sites* ausgetauscht. Danach enthält der *Entry*-Vektor das *ccdB* Gen, flankiert von *attP1* und *attP2* Sequenzen. Der Zielvektor enthält das gewünschte Fragment, flankiert von *attB1* und *attB2* Sequenzen. Anschließend wird der Reaktionsansatz in chemisch kompetente *E. coli* (Top10) Zellen transformiert und auf den Zielvektor selektiert. Dabei können Bakterienzellen, die den *Entry*-Vektor enthalten, aufgrund des toxischen *ccdB* Gens nicht wachsen.

Für die LR-Rekombination wurde folgender Reaktionsansatz genutzt:

50ng *Entry*-Vektor

150ng Zielektor

1µl LR-Clonase II

ad 10µl aqua dest.

Der gesamte Ansatz wurde 1,5h bei Raumtemperatur (ca. 25°C) inkubiert. Anschließend wurden der gesamte Reaktionsansatz in chemisch kompetente *E. coli* (Top10) Zellen transformiert.

2.2.9 Transformation elektrisch kompetenter Bakterienzellen

Die Transformation von 2µl Plasmid-DNA, in 50µl elektrokompente *E. coli* (Top10, BI21 AI), *A. tumefaciens* (GV3101) oder *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Roth1-8), erfolgte in 1mm Küvetten bei U: 2500V und R: 200 Ω. Die Bakterienzellen wurden anschließend in 250µl LB-Medium (*E. coli*), 400µl YEB-Medium (*A. tumefaciens*) oder 400µl PSA-Medium (Roth1-8) aufgenommen und 1h bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (*A. tumefaciens*, Roth1-8) inkubiert.

Danach wurden die Bakteriensuspensionen auf selektive Nährmedienplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bzw. zwei Tage bei 30°C angezogen.

2.2.10 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Top10) wurden für die Aufnahme von DNA auf Eis aufgetaut. Zu den 50µl aufgetauten Zellen wurden 5 bis 15µl des zu transformierenden Ansatzes gegeben und ca. 30min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Zellen 45sek bei 42°C ausgesetzt (Hitzeschock), mit 200µl LB-Medium versetzt und zur Regeneration 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakteriensuspensionen auf selektive Nährmedienplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen.

2.2.11 Erstellung von *Golden Gate* Modulen in pUC57

Zur Erstellung von *Golden Gate* Modulen wurden entsprechende DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden den Fragmenten, für spätere Klonierungen, spezifische *Bsa*I-Schnittstellen angefügt. Die erstellten Module wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, gereinigt und in den Vektor pUC57 kloniert. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz genutzt:

50ng pUC57

30-50ng eluiertes PCR-Produkt

1µl T4 DNA Ligase (Fermentas)

1 µl *Sma*I (10U/µl; Fermentas)
1 µl *reaction buffer yellow* (Fermentas)
1 µl 10mM ATP (Fermentas)
ad 10 µl aqua dest.

Der Reaktionsansatz wurde für 2h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Transformation chemisch oder elektrisch kompetenter *E. coli* (TOP 10) eingesetzt.

2.2.12 Erstellung artifizierlicher TAL-Effektoren bzw. TAL-Effektor-Nukleasen mit Hilfe der *Golden TAL Technology*

Die Erstellung artifizierlicher TAL-Effektoren bzw. TAL-Effektor-Nukleasen erfolgte mit Hilfe der *Golden TAL Technology* (Geißler *et al.*, 2011). Die *repeat*-Bibliothek besteht aus den *repeat*-Typen NI, HD, NN, NG und *Stopp-repeats* für die Positionen 1 bis 6 (Geißler *et al.*, 2011; Streubel, Richter, Blücher, Becker, Reschke und Boch, unpubliziert). Im ersten Schritt der Assemblierungsmethode werden *Multi-repeat*-Module (z.B. *Hexa-repeat*-Module) aus *Einzel-repeat*-Modulen in einen Zwischenvektor kloniert. Dazu wurden Plasmid-Lösungen mit einer Konzentration von 50ng/µl verwendet. Die Reaktion wurde wie folgt zusammengesetzt:

2 µl Zwischenvektor (pGTLA/pGTAB/pGTBR/pGTBC/pGTCR)
2 µl je *Einzel-repeat*-Modul (Position 1 bis 6 od. 1 bis *Stopp-repeat*)
2 µl 10 mM ATP (Fermentas)
2 µl NEB Puffer 4 (New England Biolabs)
1 µl T4-DNA-Ligase (30 U/µl, Fermentas)
1 µl Bpil (10 U/µl, New England Biolabs)
ad 20 µl (H₂O)

Die *cut ligation* Reaktion erfolgte in einem Temperaturzyklus-Steuergerät mit Heizdeckel (PTC-225 Peltier Thermal Cycler, MJ Research FlexCycler, Analytik Jena) nach folgendem Programm:

37°C 10min
20°C 10min
20°C 40min
37°C 34min
80°C 20min
4°C

Ein Teil des Reaktionsansatzes wurde in chemisch kompetente *E. coli* (Top10) transformiert, auf Nährplatten angezogen und geeignete Klone per Blau-Weiß-Selektion identifiziert. Positiv identifizierte Klone (weiße Klone) wurden mit Hilfe von Restriktionsanalysen und auf Sequenzebene überprüft.

Die auf diese Weise erstellten Multi-repeat-Module wurden im zweiten Schritt zusammen mit N- und C-terminalen Modulen zum kompletten TAL-Effektor bzw. zur kompletten TAL-Effektor-Nuklease assembliert. In dieser Arbeit wurden verkürzte N-terminale Module genutzt, welche aus den Aminosäuren 152-288 von Hax3 bestehen. Außerdem enthalten diese Module eine SV40 NLS und ein N-terminales (c-myc, HA) Epitop. Die verwendeten C-terminalen Module zur Erstellung von TALENs, sind Fusionen aus einem verkürzten C-Terminus von Hax3 (Aminosäuren 1-63) und der katalytischen Domäne der Restriktionsendonuklease *FokI*. Die erstellten TAL-Effektoren bzw. TAL-Effektor-Nukleasen wurden zunächst in einen *Golden Gate* kompatiblen *Entry*-Vektor (pEGGws; pEGGwos) assembliert. Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

2 µl Zielvektor
2,5 µl N-Terminus Hax3
2,5 µl C-Terminus Hax3
1 µl je Multi-repeat-Modul
2 µl 10 mM ATP (Fermentas)
2 µl NEB Puffer 4 (New England Biolabs)
1 µl T4-DNA-Ligase (30 U/µl, Fermentas)
1 µl *Bsal* (10 U/µl, New England Biolabs)
ad 20 µl (H₂O)

Ein Teil des Ansatzes wurde dann in chemisch kompetente *E. coli* (TOP10) transformiert. Die Selektion und Kontrolle positiver Klone erfolgte analog den Multi-repeat-Modulen. Anschließend konnten die erstellten TAL-Effektoren bzw. TAL-Effektor-Nukleasen mittels GATEWAY-Klonierung in Vektoren zur pflanzlichen oder bakteriellen Expression kloniert werden.

2.2.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde von einem entsprechenden Dienstleister (Seqlab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden 600 bis 700 ng zu sequenzierende Plasmid-DNA mit 20 pmol Oligonukleotid in einem Volumen von 7µl eingeschickt und nach dem Protokoll *Extended HotShot* vom Dienstleister bearbeitet.

2.2.14 *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte transiente Expression in *Nicotiana benthamiana*

Zur Analyse der Expression der TALENs *in planta* oder für Reportergerne wiederherstellungsstudien wurden die zu untersuchenden Konstrukte mittels *A. tumefaciens* transient in *N. benthamiana* exprimiert. Dazu wurden *Agrobacterium*-Stämme, welche Plasmide mit den zu testenden Konstrukten enthalten, zwei Tage bei 30°C auf Selektionsmedium angezogen. Anschließend wurden die Bakterienstämme in 300µl AIM resuspendiert und wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,9 eingestellt. Die *Agrobacterium*-Stämme wurden untereinander oder AIM im Verhältnis 1:1 gemischt, sodass eine finale OD₆₀₀ von ca. 0,3 erreicht wurde. Die Bakteriensuspensionen wurden, mit Hilfe einer kanülenlosen Spritze, in die Blätter von *N. benthamiana* inokuliert.

2.2.15 Aktivitätstest der TALENs – *in vitro* cleavage assay

Um die Aktivität der TALENs zu testen wird zunächst die Zielsequenz via PCR amplifiziert und in einen geeigneten Vektor kloniert. In dieser Arbeit wurden die PCR-Produkte in den pENTR/D-TOPO Vektor kloniert. Anschließend wurde das Reporter-Plasmid linearisiert, um die Spaltung der DNA durch das Entstehen von 2 Spaltungsfragmenten sichtbar zu machen. Hier wurden die pENTR/D-TOPO Derivate mit der Restriktionsendonuklease *PvuII* gespalten, das Enzym inaktiviert und die linearen DNA-Fragmente, mit Hilfe des GeneJET™ PCR Purification Kits (Fermentas GmbH; St. Leon Rot), gereinigt.

Die TALEN-Proteine wurden entweder in *E. coli* oder *in vitro*, mittels *TnT T7 Transcription/Translation* Kit, exprimiert. Die in *E. coli* exprimierten Proteine wurden 1:10 mit Elutionspuffer verdünnt und je TALEN ca. 1µl Proteinlösung eingesetzt. Von den *in vitro* exprimierten Proteinen wurden direkt ca. 4µl für den Aktivitätstest verwendet.

Mit den TALEN-Proteinen wurde nun eine Restriktionsspaltung durchgeführt. Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

- 8 µl H₂O (aqua dest)
- 2 µl NEB Buffer 3 (New England Biolabs)
- 5 µl *purified* BSA (10mg/ml; New England Biolabs)
- 1 µl linearisiertes Plasmid (ca. 200ng)
- 4 µl *TnT T7* Reaktion (beide TALENs)
- bzw.
- je 1 µl *E. coli* exprmierte TALENs (1:10 Verdünnung)
- 20µl gesamt

Der Reaktionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine 20min bei 65°C denaturiert, 10min bei 1.700rcf und 3min bei 16.000rcf pelletiert. Der entstehende Überstand wurde dann mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.16 Reportergergenwiederherstellungsstudien

Für Reportergergenwiederherstellungsstudien wurden *A. tumefaciens* GV3101 Stämme, die ein Plasmid enthalten, welches das zu untersuchende Expressionskonstrukt oder das jeweilige GUS-Reporterkonstrukt kodiert, in AIM resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,9 eingestellt. Zum Test der TALENs *in vivo* wurden die *Agrobacterium*-Stämme, welche die zwei TALENs eines Paares enthalten und ein *Agrobacterium*-Stamm, welcher ein GUS-Reporter-Konstrukt enthält, im Verhältnis 1:1:1 gemischt (Endkonzentration pro Stamm: OD₆₀₀ von ca. 0,3). Anschließend wurden die Bakteriengemische in je ein Blatt von drei unterschiedlichen *N. benthamiana* Pflanzen inokuliert.

2.2.16.1 Quantitative Analyse der β -Glucuronidase Aktivität

Zwei Tage nach Inokulation erfolgte die Ernte von zwei Blattscheiben je Infiltrationsstelle mit einem 5er Korkbohrer (Durchmesser 0,7cm). Die Blattscheiben wurden zusammen mit zwei Metallkugeln in ein „Safelock“ Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der Aufschluss des eingefrorenen Blattmaterials erfolgt mit Hilfe einer Kugelmühle (Retsch GmbH; Haan) für 40sek bei einer 30er Frequenz. Danach wurde das Pflanzenmaterial mit 300 μ l GUS-Extraktionspuffer versetzt und 5min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. 200 μ l des Überstandes wurden in eine „96 Well“ PCR-Platte umpipettiert und erneut, 5min bei 4.000 rpm und 4°C, zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 100 μ l in eine neue PCR-Platte überführt. Nun wurden, zur Erstellung von technischen Duplikaten, je 10 μ l der Proben in zwei neue PCR-Platten pipettiert und mit 90 μ l GUS-Extraktionspuffer, der 5mM MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid; AppliChem GmbH, Darmstadt) enthielt, gemischt. Für die Proteinbestimmung mittels Bradford Assay sind weiterhin 10 μ l der Proben in eine PCR-Platte überführt und mit 90 μ l Wasser gemischt wurden. Nun wurden die, mit GUS-Extraktionspuffer und MUG versetzten, Proben 60 bis 90min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 10 μ l in eine neue PCR-Platte überführt und mit 90 μ l 0,2 M Natriumcarbonat abgestoppt und in schwarze Platten mit durchsichtigem Boden umpipettiert. Die Analyse der Proben (Fluoreszenzmessung) wurde mittels „Spectrafluor“ (Tecan Group Ltd.; Mannedorf Schweiz) bei einer Emission von 465 nm und einer Anregungswelle von 360 nm durchgeführt. Als Standard diente 10 μ M 4-Methylumbelliferon (MU; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München). Abschließend wurde die Proteinbestimmung mit Hilfe des Bradford Assays durchgeführt.

Für die Berechnung der β -Glucuronidase-Aktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{AGUS (U)} = \Delta F \times 10 \text{ pmol MU}$$

$$t [\text{min}] \times \text{mg Protein} \times \text{F10 pmol MU}$$

ΔF = Fluoreszenz-Wert der Probe unter Abzug der Hintergrundaktivität

F10 pmol MU = Fluoreszenzwert des Standards

T = Reaktionszeit in Minuten

AGUS [U] = β -Glucuronidase Aktivität in Units

Eine β -Glucuronidase Einheit (U) ist definiert als 1 pmol produziertes 4-Methylumbilliferon, pro Minute, pro Protein. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel.

2.2.16.2 Proteinbestimmung mittels Bradford Assay

Für die Proteinbestimmung mittels Bradford Assay wurden die vorbereiteten Proben, 10 μ l Proben gemischt mit 90 μ l Wasser, mit 770 μ l H₂O und 200 μ l Roti®-Quant (Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe) gemischt und für 20 bis 30 Minuten bei RT inkubiert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde BSA-Eichreihe erstellt: 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 70 μ g/ml, 100 μ g/ml und 150 μ g/ml.

Anschließend wurde die Absorption, bei einer Wellenlänge von 595nm, gemessen und auf die BSA-Eichgerade mit definierten Konzentrationen bezogen.

2.2.16.3 Qualitative Analyse der β -Glucuronidase Aktivität

Zusätzlich zur quantitativen Analyse wurde eine qualitative Analyse der β -Glucuronidase Aktivität durchgeführt. Dabei wird das Substrats X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) durch die β -Glucuronidase hydrolysiert und durch Reaktion mit dem Sauerstoff der Luft wird das zu untersuchende Material blau gefärbt. Somit gibt die Blaufärbung die Aktivität der β -Glucuronidase an. Dafür wurden zwei Tage nach Inokulation, je Infiltrationsstelle, eine Blattscheibe (5er Korkbohrer, Durchmesser 0,7cm) geerntet und gepoolt (3 Blattscheiben von 3 unterschiedlichen Pflanzen). Nun wurde 1ml GUS-Färbelösung zugegeben und mit Hilfe einer kanülenloser Spritze vakuuminfiltiert. Anschließend wurden die Blattscheiben über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Blattscheiben mit Ethanol entfärbt.

2.2.17 Analyse der subzellulären Lokalisation

Der Test der subzellulären Lokalisation der TAL-Effektor-Nukleasen bzw. TAL-Effektoren erfolgte mit Hilfe eines N-terminalen GFP-Epitops. Die zu testenden Proteine wurden via *Agrobacterium* transient in *N. benthamiana* exprimiert. Zwei Tage der nach der Inokulation

wurden Blattscheiben geerntet, mit Wasser vakuumfiltriert, auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Anschließend wurden die Gewebeproben mit Hilfe eines konfokalen *laser scanning* Mikroskops (LSM) analysiert.

2.2.18 Analyse der Expression von TAL-Effektor-Nukleasen

2.2.18.1 Aufarbeitung von Pflanzenmaterial

Zur Analyse der Expression der TALENs in *N. benthamiana* wurden, zwei Tage nach Inokulation, zwei Blattscheiben je Blatt geerntet (5er Korkbohrer) und in Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Blattscheiben in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pflanzenmaterial wurde nun mechanisch, mit Hilfe von vorgekühlten Metallmörsern, aufgeschlossen und mit 85µl 4 x Lämmli versetzt. Um die Proben zu denaturieren, wurden sie durch vortexen gemischt und 10min bei 95°C inkubiert.

Nach der Denaturierung wurden die Pflanzentrümmer durch Zentrifugieren (5min bei 14.000 rpm) von den Proteinen getrennt. Anschließend wurde der Überstand auf ein SDS-Gel geladen.

2.2.18.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Proteine, nach ihrem Molekulargewicht, erfolgte mittels SDS-PAGE. Um eine höhere Trennleistung zu erzielen wurden diskontinuierliche Gele, bestehend aus Sammelgel (4%ig) und Trenngel (10%ig), verwendet. Der Gellauf erfolgte in vertikalen Apparaturen für Mini-Gele (Mighty Small II, Amersham Biosciences, Freiburg). Als Größenstandard diente der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ von Fermentas. Die Probenvolumina betragen 15 bis 20µl. Die Elektrophorese wurde bei 130V und 25mA pro Gel in 1 x Tank-Puffer durchgeführt.

2.2.18.3 Nachweis von Proteinen mittels Coomassie Färbung

Zunächst wurden die Proteine, entsprechend ihres Molekulargewichts, mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die SDS-Gele für 30min in Coomassie Färbelösung geschwenkt. Danach werden die Gele mit Wasser entfärbt.

2.2.18.4 Immunoblot Analyse

Der Nachweis exprimierter Proteine erfolgte mit Hilfe des Immunoblots. Dafür wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran („Whatman“ ProtranR, Schleicher und Schuell GmbH) übertragen. In dieser Arbeit geschah dies mittels *Semidry*-Blot bei 125mA. Anschließend wurde die Membran 30 bis 60min in 5% Milchpulver und 3% BSA (Bovines Serumalbumin Fraktion V) gelöst in 1 x TBST blockiert.

Nun konnte die Membran, über Nacht bei 4°C, mit dem Primärantikörper inkubiert werden. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran 3x für 5 bis 10 Minuten mit 1x TBST gewaschen und anschließend für 1,5h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper unter Verwendung des entsprechenden *hrp*-Konjugats (anti-Maus-Ig gegen anti-c-myc und anti-Ratte-Ig gegen anti-HA) inkubiert. Danach wurde die Membran 3x für 10min mit 1xTBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels der *enhanced chemiluminescence* (ECL; Amersham Biosciences, Freiburg) Methode. Dazu wurde die Membran für 1min mit der Detektionslösung inkubiert und anschließend durch Belichtung eines Biomax Light 1-Film (Eastman Kodak Company, Rochester, USA) entwickelt.

2.2.19 Expression der TALENs *in vitro* mittels Transkriptions/Translations Kit

Um eine Vielzahl von TALEN Proteinen in kurzer Zeit testen zu können, wurden diese mit Hilfe des *TnT(R) T7 Quick Coupled Transcription/Translation System in vitro* exprimiert. Dafür wurde ein *TnT T7 Quik Coupled Mastermix* aufgetaut. Zu den 40µl *Mastermix* wurden 2µl Methionin (1mM) sowie 500-1000ng Plasmid-DNA, von beiden TALENs eines Paares (insgesamt 1000-2000ng), zugegeben. Danach wurde der Reaktionsansatz für 90min bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit ist die *in vitro* Expression abgeschlossen und die Proteine können direkt für einen Aktivitätstest genutzt werden. Zum längeren aufbewahren der Proteine können dem Reaktionsansatz 20% Glycerin zugegeben und bei -20°C, ca. 1-2 Wochen, gelagert werden.

2.2.20 Inokulation von *Xoo* in Reis

Der zu inokulierende *Xoo*-Stamm wurde auf PSA-Medium angezogen und in einer 10mM MgCl₂-Lösung auf eine OD_{600nm} von 0,5 eingestellt.

Für die Inokulation wurde eine nadellose Spritze verwendet. Je Reispflanze wurden die zwei jüngsten, vollentwickelten Blätter inokuliert.

Für die phänotypischen Analysen wurden in einem Bereich von 5 cm (beginnend ab ca. 1 cm von der Blattspitze) 5-6 Inokulationspunkte gemacht. Nach ungefähr sieben Tagen wurden die Blätter geerntet und dokumentiert.

Für die Expressions-Analysen wurden ein Bereich von 5 cm (beginnend ab ca. 1 cm von der Blattspitze) komplett inokuliert. Dabei wurde Inokulationspunkt an Inokulationspunkt gemacht. Nach 24 Stunden wurden die 5cm Blatt-Bereiche in ein *Safe-Lock* Eppendorfgefäß geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Proben bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

2.2.21 Gen-Expressions-Analyse nach Xoo-Infektion

Drei bis vier Wochen alte Reispflanzen (Nipponbare) wurden mit verschiedenen Xoo-Stämmen behandelt. Das behandelte Material wurde nach 24 h geerntet, in Flüssigstickstoff gefroren und für die Isolierung der Gesamt-RNA verwendet.

2.2.22 Gesamt-RNA-Isolierung aus pflanzlichem Gewebe

Das tiefgefrorene Pflanzenmaterial wurde zusammen mit zwei Metallkugeln im TissueLyser II gemörsert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte über das Kit RNeasy Mini von der Firma QIAGEN. Die isolierte RNA wurde photometrisch vermessen und auf Verunreinigungen durch Salze oder Proteine überprüft.

2.2.23 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde ausschließlich isolierte RNA verwendet, die nach der photometrischen Vermessung, nach Möglichkeit, sehr geringe bis keine Kontaminationen durch Salze oder Proteine hatten. Es wurde das *Maixima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

2.2.24 Quantitative Echtzeit PCR (*quantitative real time PCR* - qRT-PCR)

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mit einem Gemisch aus 12,5 ng cDNA, 1 pmol *forward*-Primer, 1 pmol *reverse*-Primer und 10 µl *ABsolute Blue QPCR Mix* von Thermo Fisher Scientific. Für jede zu untersuchende Variante wurden zwei technische Replikate angelegt. Das Ersetzen der cDNA durch Wasser diente als Negativ-Kontrolle. Die PCR und *SYBR-Green*-Detektion erfolgte über das *CFX Connect Real-Time PCR Detection System* von Bio-Rad Laboratories. Die Spezifität der Primerpaare wurde über eine Schmelzkurve überprüft. Die Berechnung der *fold induction*, erfolgte über folgende Formel:

$$\frac{(\text{GOI})\text{Primereffizienz}^{\text{ct-Wert (Referenz)} - \text{ct-Wert(Probe)}}}{(\text{Actin})\text{Primereffizienz}^{\text{ct-Wert (Referenz)} - \text{ct-Wert(Probe)}}}$$

Die Primereffizienz für ein spezifisches Primerpaar wird durch eine durchgeführte Standardreihe aus unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen ermittelt. Der ct-Wert ist der *cycle threshold* und beschreibt den Beginn der exponentiellen Phase. Links in Klammern wird die Genspezifität der Primerpaare beschrieben. GOI= *gene of interest*.

2.2.25 Identifikation von potentiellen Zielgenen von Xoo TALEs mittels RNAseq-Analyse

Die RNAseq-Analyse wurde mit dem Reiskultivar Nipponbare und den sequenzierten Xoo-Stämmen PXO83, PXO142, PXO35 und ICMP3125 sowie einer MgCl₂-Kontrolle (mock) durchgeführt. Die Inokulation für die RNAseq-Analyse erfolgte wie für eine Expression-Analyse (Kapitel 2.2.19). Dafür wurden pro Stamm und Kontrolle 18 Blätter von *Nipponbare* Pflanzen inokuliert. Es wurden drei Replikate an unterschiedlichen Tagen hergestellt. Für jedes Replikat wurden pro Probe (Xoo-Stamm oder mock) zwei Blätter von drei Reispflanzen inokuliert (Abb. 3.3.5.1). Die Proben wurden nach 24 Stunden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert. Zur Kontrolle der Infektionen der Reispflanzen mit den einzelnen Stämmen, wurden die RNA Proben einzeln mit Hilfe einer qRT-PCR getestet.

2.2.26 Photometrische Messung des Salizylsäure-Level in Pflanzen

Für die photometrische Bestimmung des Salizylsäure-Level in Reis wurden Reispflanzen einmal nicht infiziert, mit einer MgCl₂-Lösung oder dem Xoo-Stamm Roth1-8 infiziert. Die Inokulation erfolgte analog Kapitel 2.2.19. Die Proben wurden 24 Stunden nach Inokulation geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Messung des Salizylsäure-Level erfolgte nach dem Protokoll von Warriar *et al.*, 2013. Dabei werden die Pflanzenproben für 10 Minuten mit warmen Wasser, unter schütteln, gewaschen. Anschließend werden die Pflanzenproben mit einer 2%igen FeCl₃-Lösung inkubiert. FeCl₃ bildet mit Salizylsäure einen lila Komplex, welchen man photometrisch bei 540nm bestimmen kann. Für die Messung wurde eine Standard-Reihe Salizylsäure mit 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000µg Salizylsäure hergestellt und vermessen. Mit Hilfe der Standardkurve wurde der Salizylsäuregehalt der einzelnen Proben ermittelt.

2.2.27 Erstellung des scFokI-Moduls

Das scFokI-Modul wurde mit Hilfe der soe-PCR-Technik erstellt. Als Template für die soe-PCR des Moduls dienten die Module C63FokDS und C63FokRR. Als erstes wurde mit den Primern Hax3-4-C-F und scFok-A-R das erste PCR-Fragment erstellt. Das zweite PCR-Fragment wurde mit den Primern scFok-B-F und scFok-B-R erstellt. Über die Primer scFokA-R und scFokB-F wurde je ein Teil des 35 Aminosäure-Linkers und *Bsa*I-Schnittstellen mit einem spezifischen Überhang angefügt. Die PCR Fragmente wurden gereinigt und in pUC57 kloniert. Im zweiten Schritt wurde eine Golden Gate-Reaktion durchgeführt und eine scTALEN erstellt. Im letzten Schritt diente die erstellte scTALEN als Template einer PCR mit den Primern Hax3-4-C-F und scFok-B-R. Das PCR-Fragment wurde gereinigt und in den Vektor pUC57 kloniert.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung Resistenter Reispflanzen mit Hilfe gerichteter Promotor-Mutation

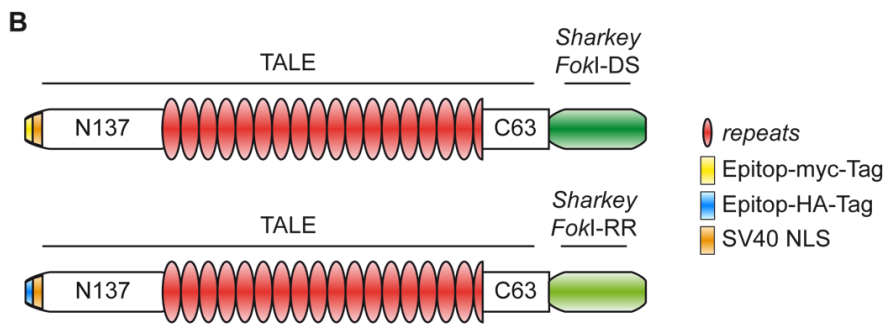
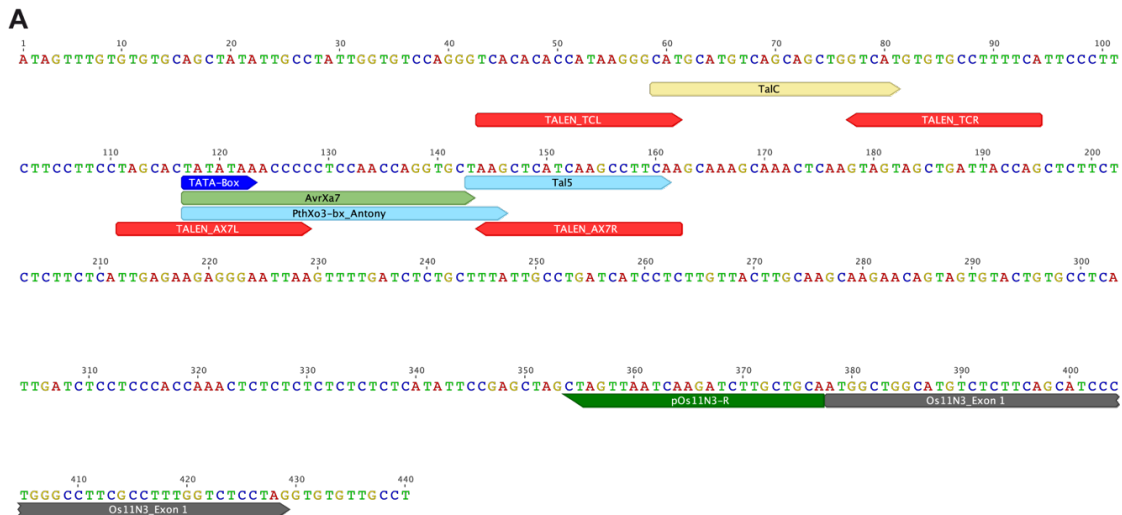
Die TALEs AvrXa7, PthXo3, Tal5 sowie TalC wurden in unterschiedlichen *Xoo*-Stämmen aus geografisch unterschiedlichen Regionen gefunden. All diese TALEs binden in der Promotorregion des Reis-Gens *OsSWEET14* und aktivieren dieses. Somit kann *OsSWEET14* als eines der wichtigsten Suszeptibilitätsgene in der Interaktion zwischen *Xoo* und Reis bezeichnet werden. Ist eine Induktion dieses Gens durch *Xoo* nicht möglich, da die TALEs nicht im Promotor binden können oder im korrespondierenden Stamm deletiert wurden, kann ein Verlust der Virulenz von *Xoo* beobachtet werden (Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Streubel *et al.*, 2013; Boch *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015).

Diese Beobachtung kann zur Generierung resistenter Reispflanzen genutzt werden, indem mit Hilfe von TALE-Nukleasen die Bindestelle der TALEs im Promotor von *OsSWEET14* mutiert wird. Auf diese Weise kann ein rezessives R-Gen erzeugt werden.

3.1.1 Klonierung und Test von TALE-Nukleasen

Für die Herstellung von resistenten Reispflanzen wurden während meiner Masterarbeit zwei TALEN-Paare entworfen, welche die TalC-Box sowie die Avrxa7/Pthxo3/Tal5-Box mutieren sollen (Reschke, 2012). Dabei wurden die TALEN-Paare so gelegt, dass der *Spacer*-Bereich, indem der DSB eingefügt wird, in den TALE-Boxen liegt (Abb. 3.1.1A). Somit wird der DSB in der TALE-Box eingefügt und anschließend repariert. Schlussendlich kommt es zur Mutation der TALE-Box.

Die TALEN wurden mit Hilfe der *Golden TAL-Technology* kloniert. Als Rückgrat diente dabei die N- und C-terminale Region des TALE Hax3. Auf diesem TALE basieren die meisten Module der *Golden TAL-Technology* Bibliothek (Geißler *et al.*, 2011). Für die Klonierung der TALEN-Konstrukte wurde eine verkürzte N-terminale Region mit 137 Aminosäuren und eine verkürzte C-terminale Region mit 63 Aminosäuren verwendet (Abb. 3.1.1B). Es ist bekannt, dass für TALE-Nukleasen mit einer ähnlichen Architektur hohe Aktivitäten beobachtet werden konnten (Miller *et al.*, 2011; Sun & Zhao, 2013). Die *repeat*-Region der TALEN besteht aus 16,5 bzw. 17,5 *repeats*. Die RVD-Sequenzen und die korrespondierenden TALEN-Boxen sind in Abb. 3.1.1C dargestellt.



C

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	17,5	
TALEN TCL		HD	NI	HD	NI	HD	NI	HD	HD	NI	NG	NI	NI	NI	NN	NN	HD	NI	NG	
box		T	C	A	C	A	C	A	C	C	A	T	A	A	G	G	G	C	A	T
TALEN TCR		NN	NI	NI	NI	NI	NN	NN	HD	NI	HD	NI	HD	NI	NG	HD	NI	NN		
box		T	G	A	A	A	A	G	G	C	A	C	A	C	A	T	C	A	G	
TALEN AX7L		NI	NN	HD	NI	HD	NG	NI	NG	NI	NG	NI	NI	NI	HD	HD	HD	HD	HD	
box		T	A	G	C	A	C	T	A	T	A	T	A	A	A	C	C	C	C	
TALEN AX7R		NG	NN	NI	NI	NN	NN	HD	NG	NG	NN	NI	NG	NN	NI	NN	HD	NG		
box		T	T	G	A	A	G	G	C	T	T	G	A	T	G	A	G	C	T	

Abbildung 3.1.1 Position und Aufbau der verwendeten TALE-Nukleasen.
A) Ausschnitt aus dem Promotor des Suszeptibilitätsgens *OsSWEET14*. Dargestellt sind die 377bp vor dem Start-Codon. Die Bindestellen der TALEs TalC (gelb), AvrXa7 (blau), PthXo3 und Tal5 (hellblau) sind eingezeichnet. Weiterhin sind die Bindestellen der verwendeten TALEN in rot eingezeichnet. Die TALEN sind in einer *tail-to-tail*-Orientierung designt mit einem *Spacer*-Bereich von 15bp, zwischen den Bindestellen der linken und rechten TALEN. Der *Spacer*-Bereich ist so gewählt, dass dieser die TALE-Box von TalC bzw. AvrXa7 überspannt. Des Weiteren ist der ORF von *OsSWEET14* (grau), eine mögliche TATA-Box (blau) und der *reverse*-Primer pOs11N3-R (grün) dargestellt. **B)** Schematische Darstellung der verwendeten TALEN. Die TALEN besitzen einen verkürzten N- (137AS) und C-Terminus (63AS). Weiterhin verfügen sie N-terminal über einen Epitop-Tag und das Kernlokalisierungssignal des SV40 Virus. An den verkürzten C-Terminus wurde eine modifizierte katalytische Domäne des Restriktionsenzym *FokI* fusioniert. **C)** RVD-Sequenzen der TALEN sowie deren korrespondierenden Boxen.

Die erstellten TALEN-Paare wurden anschließend *in vitro* und *in vivo* getestet (Reschke, 2012). Beide TALEN-Paare schneiden DNA in einem *in vitro cleavage assay* und sind somit *in vitro* aktiv. Die Aktivität *in planta* wurde mit Hilfe eines transienten Reportergen-Rekonstitutions-Assay in der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* getestet. Dabei konnte nur für das TALEN-Paar Ax7L/Ax7R Aktivität gezeigt werden.

Aufgrund der *in vitro* Aktivität beider TALEN-Paare, wurden für die Generierung resistenter Reispflanzen beide TALEN-Paare getestet. Dafür wurden die einzelnen TALEN-Konstrukte mit Hilfe des GATEWAY-Klonierungssystems in pCAMBIA Expressionsvektoren für monokotyledone Pflanzen kloniert. Diese Vektoren ermöglichen eine konstitutive Expression der TALEN unter Kontrolle des Reis-Ubiquitin-Promotors. Die jeweilige TALEN-Links wurde in den Vektor pC2300OE kloniert, welcher eine Hygromycin-Resistenz zur Selektion in Pflanzen besitzt. Die jeweilige TALEN-Rechts wurde in den Vektor pC5300OE kloniert, welcher eine Geneticin-Resistenz zur Selektion in Pflanzen besitzt.

3.1.2 Generierung resistenter Reispflanzen mit Hilfe von TALEN

Die erstellten TALEN-Konstrukte wurden zu unseren Kooperationspartnern am IRD und CIRAD in Montpellier (Frankreich) geschickt. Dort wurden, mit Hilfe der von mir erstellten TALEN, resistente Reispflanzen generiert (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016). Zum besseren Verständnis meiner Ergebnisse in Kapitel 3.1.3 gehe ich im Folgenden kurz auf die Generierung der resistenten Reispflanzen unserer Kooperationspartner ein.

Im ersten Schritt wurden die zwei TALEN-Konstrukte je Paar in *A. tumefaciens* transformiert. Für die Erstellung resistenter Reispflanzen wurden die *Agrobacterium*-Stämme für die Linke und Rechte TALEN gemischt und eine Reis-Kallus-Transformationen durchgeführt (Abb. 3.1.2).

Als Callus bezeichnet man einen Komplex undifferenzierter, totipotenter Zellen, welcher aus Pflanzengewebe entstanden ist. Es wurden die Reis Kultivare Kitaake und Nipponbare transformiert. Reis-Calli werden zunächst unter Verwendung des Phytohormons 2,4-D aus Reissamen induziert und vermehrt. Anschließend wurden die TALEN-Konstrukte via *A. tumefaciens* in die Calli transformiert und ko-kultiviert. Nach der Transformation werden die Calli, welche beide TALEN-Konstrukte tragen, mit Hygromycin und Geneticin, selektiert. Reis-Calli, welche beide TALEN-Konstrukte tragen, können nun die TALEN exprimieren. Diese binden an ihre spezifische Bindestelle und fügen einen DSB in die DNA ein, welcher von der pflanzlichen Zelle repariert wird und so Mutationen in der TALE-Bindestelle erzeugt.

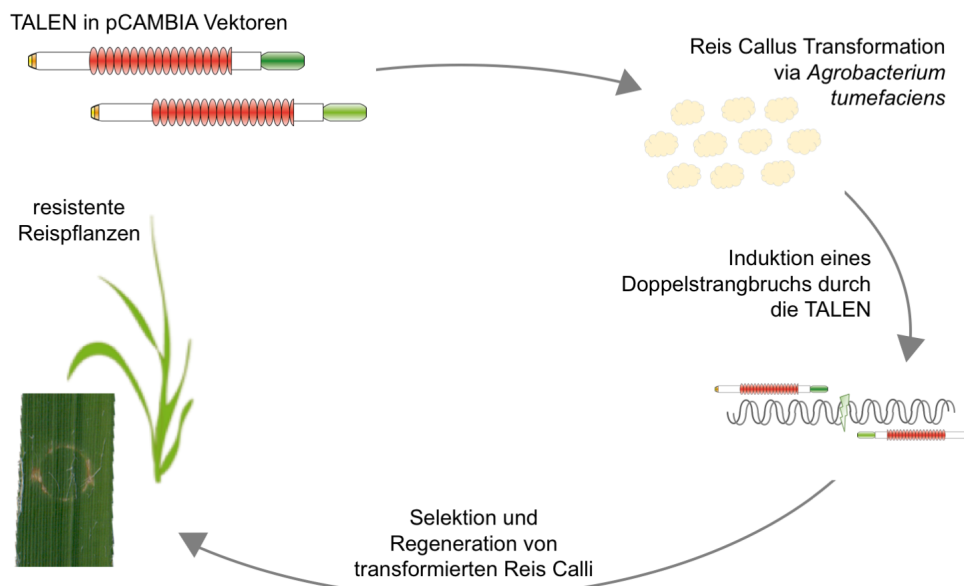


Abbildung 3.1.2 Flussdiagramm zur Generierung resistenter Reispflanzen.

Die TALEN-Konstrukte wurden in Expressionsvektoren kloniert, welche eine konstitutive Expression der TALEN unter Kontrolle des Reis-Ubiquitin Promotors sicherstellen.

Nach der Selektion erfolgt die schrittweise Regeneration der Reis-Calli zur Reispflanze. Dabei wird zuerst das Wurzelwachstum und danach das Sprosswachstum induziert. Die erzeugten Stecklinge wurden via PCR auf das Vorhandensein beider Transgene (TALEN TCL/TCR oder Ax7L/Ax7R) getestet. Es konnte gezeigt werden, dass 90% bzw. 84% der T0-Stecklinge beide Transgene besitzen. Für die Charakterisierung möglicher Mutationen wurde ein 342bp großes PCR-Fragment sequenziert. Es konnte festgestellt werden, dass bei 51% (AvrXa7-Box) bzw. 30% (TalC-Box) der Pflanzen, welche beide Transgene tragen, eine oder beide Genkopien verändert wurden (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016). Die Mutationen sind entweder Deletionen, Insertionen oder eine Kombination aus beiden. Alles in allem konnten 41 unterschiedlich editierte Allele für die AvrXa7-Box gefunden werden, wobei 13 ebenfalls die Tal5-Box betreffen. Für die TalC-Box konnten 26 unterschiedlich editierte Allele identifiziert werden (Tab. 3.2.1; Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016).

Für die Analyse der Transmission und Segregation der Mutationen in die T1-Generation, wurden 19 AvrXa7-Box und 16 TalC-Box editierte Allele ausgewählt und untersucht. Sequenzierungen des *OsSWEET14* Promotors zeigen, dass alle Mutationen in die nächste Generation übertragen wurden. Das Segregationsmuster entspricht, mit drei Ausnahmen, der Mendelschen Segregation (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016).

Für alle weiteren Analysen zur Resistenz gegenüber Infektionen mit *Xoo*-Stämmen wurden T2 oder T3-Pflanzen mit homozygoten TALE-Box Mutationen verwendet.

	AvrXa7-Box	TalC-Box
Anzahl an untersuchten T0-Pflanzen	135	171
Anzahl an T0-Pflanzen, welche beide Transgene targen	113	154
Anzahl an T0-Pflanzen, welche editiert wurden	58	46
Effizienz (editierte vs. untersuchte Pflanzen)	51%	30%
Anzahl der erhaltenen unabhängigen T0-Linien	30	23
Anzahl von unterschiedlich editierten Allelen (Deletion/Insertion/Kombiniert)	41 (27/3/11)	26 (19/2/5)
Anzahl von unabhängigen T0-Linien, welche in der T1-Generation genotypisiert wurden	11	10
Anzahl von unterschiedlich editierten homozygoten Allelen (Deletion/Insertion/Kombiniert)	19 (15/1/3)	16 (13/2/1)
Anzahl an Transgen-Freien T1-Linien, welche ein homozygot editiertes Allel besitzten	10	5

Tabelle 3.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Reis-Transformation zur Mutation der Avrxa7- und TalC-Box in *O. sativa* cv. Kitaake (verändert nach Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016).

3.1.3 Analyse ausgewählter resistenter Reislinien

Nach der Generierung der editierten Reispflanzen, wurden uns Samen von 10 T2/T3-Linien von unseren Kooperationspartnern zugesandt. Nun sollte zum einen getestet werden, ob die beschriebenen Mutationen auch in diesen Pflanzen noch vorliegen. Zum anderen sollte getestet werden, ob die editierten Pflanzen gegenüber Infektionen mit den Stämmen PXO83, welcher den TALE AvrXa7 besitzt, und BAI3, welcher den TALE TalC besitzt, resistent sind.

Es wurden die Kitaake-Linien sweet14-10, sweet14-11 und sweet14-32 untersucht (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016). Die Linien sweet14-10 und sweet14-11 wurden in der AvrXa7-Box mutiert und sollten nun gegen Infektionen von *Xoo*-Stämmen, welche die TALEs AvrXa7, PthXo3 oder Tal5 besitzen, resistent sein. Die Linie sweet14-32 wurde in der TalC-Box editiert und sollte nun gegen Infektionen von *Xoo*-Stämmen, welche den TALE TalC besitzen resistent sein.

Als erstes sollte die durch unsere Kooperationspartner beschriebene Mutation der Linien mittels Promotorsequenzierung bestätigt werden. Dafür wurden die drei editierten Linien und die Wildtyp Kitaake Linie ausgesät. Nach zwei Wochen wurden Blattabschnitte geerntet und genomische DNA isoliert. Es wurde ein 1000bp großes Fragment des *OsSWEET14* Promotors, mit Hilfe der Primer pOs11N3-1kb-seqF und pOs11N3-R, amplifiziert und anschließend mit dem *reverse*-Primer pOs11N3-R sequenziert. Das Ergebnis der Promotorsequenzierung ist in Abbildung 3.1.3A dargestellt. In der Konsensus-Sequenz sind die Bindestellen der TALEs TalC, AvrXa7, PthXo3 und Tal5 sowie die Bindestellen der genutzten TALEN Paare TCL/R und Ax7L/R eingezeichnet. Die

Sequenzen der editierten Linien, *sweet14-10* und *sweet14-11*, weisen Deletionen in der *AvrXa7/PthXo3/Tal5*-Box auf. Dies ist an den rot hinterlegten Strichen zu erkennen (Abb. 3.1.3A). Bei der Linie *sweet14-10* sind 28bp und bei der Linie *sweet14-11* sind 33bp deletiert wurden. Bei der Linie *sweet14-32* ist eine Deletion in der *TalC*-Box erkennbar, dabei wurden 24bp deletiert. Somit konnten die bereits beschriebenen Mutationen der TALE-Boxen bestätigt werden.

Als nächstes sollte getestet werden, ob die erzeugten Mutationen der TALE-Boxen in den einzelnen Reislinien einen Einfluss auf die Virulenz der *Xoo*-Stämme PXO83 und BAI3 haben. Für das Experiment wurden die *Xoo*-Stämme PXO83, BAI3, *BAI3 Δ talC* und *BAI3 Δ talC+talC* verwendet. Um die Virulenz der jeweiligen *Xoo*-Stämme zu analysieren, wurden diese mittels Spritze in die Reislinie *sweet14-10*, *sweet14-11*, *sweet14-32* und Kitaake Wildtyp inokuliert. Fünf Tage nach Inokulation wurden die Phänotypen ausgewertet und fotografiert. Als Kontrolle fungierte der Kitaake Wildtyp. Kitaake Wildtyp-Pflanzen sind für eine Infektion mit den *Xoo*-Stämmen PXO83 und BAI3 suszeptibel. Diese beiden Stämme haben je einen TALE, *AvrXa7* bzw. *TalC*, welcher das Suszeptibilitätsgen *OsSWEET14* aktiviert. Dadurch bilden sich typische Virulenzsymptome, die als dunkelgrüne wässrige Läsionen ausgehend von der Inokulationsstelle sichtbar sind (Abb. 3.1.3B).

Der *Xoo*-Stamm *BAI3 Δ talC* ist aufgrund der Deletion des TALE-Gens *talC* nicht virulent. Durch die Deletion fehlt diesem Stamm die Fähigkeit *OsSWEET14* zu aktivieren. Die Virulenz kann jedoch durch eine Komplementation, mit dem *talC*-Gen auf einem Plasmid, wiederhergestellt werden (Abb. 3.1.3B).

Für die in der *AvrXa7*-Box editierten Linien *sweet14-10* und *sweet14-11* können Virulenzsymptome für die Inokulation mit den Stämmen BAI3 und *BAI3 Δ talC+talC* beobachtet werden. Bei der Inokulation mit PXO83, welcher den TALE *AvrXa7* besitzt, lassen sich keine Symptome erkennen, da der TALE nicht länger im Promotorbereich binden und *OsSWEET14* aktivieren kann (Abb. 3.1.3B). Somit kann man anhand dieses Ergebnisses feststellen, dass die beiden Mutationen in den Linien *sweet14-10* und *sweet14-11* zu einer Reduktion bzw. einem Verlust der Virulenz von PXO83 führen.

Bei der Reislinie *sweet14-32* können für die Inokulation mit dem *Xoo*-Stamm PXO83 Virulenzsymptome beobachtet werden, jedoch nicht für die Inokulationen mit den Stämmen BAI3 und *BAI3 Δ talC+talC* (Abb. 3.1.3B). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Linie *sweet14-32* in der *TalC*-Box mutiert wurde. Die Stämme BAI3 und *BAI3 Δ talC+talC* besitzen zur Aktivierung des Gens *OsSWEET14* den TALE *TalC*. Durch die Deletion in der Bindestelle des TALEs, kann dieser nicht länger im Promotor von *OsSWEET14* binden. Dadurch kommt es nicht zur Aktivierung des Gens und die Stämme können keine Symptome ausbilden.

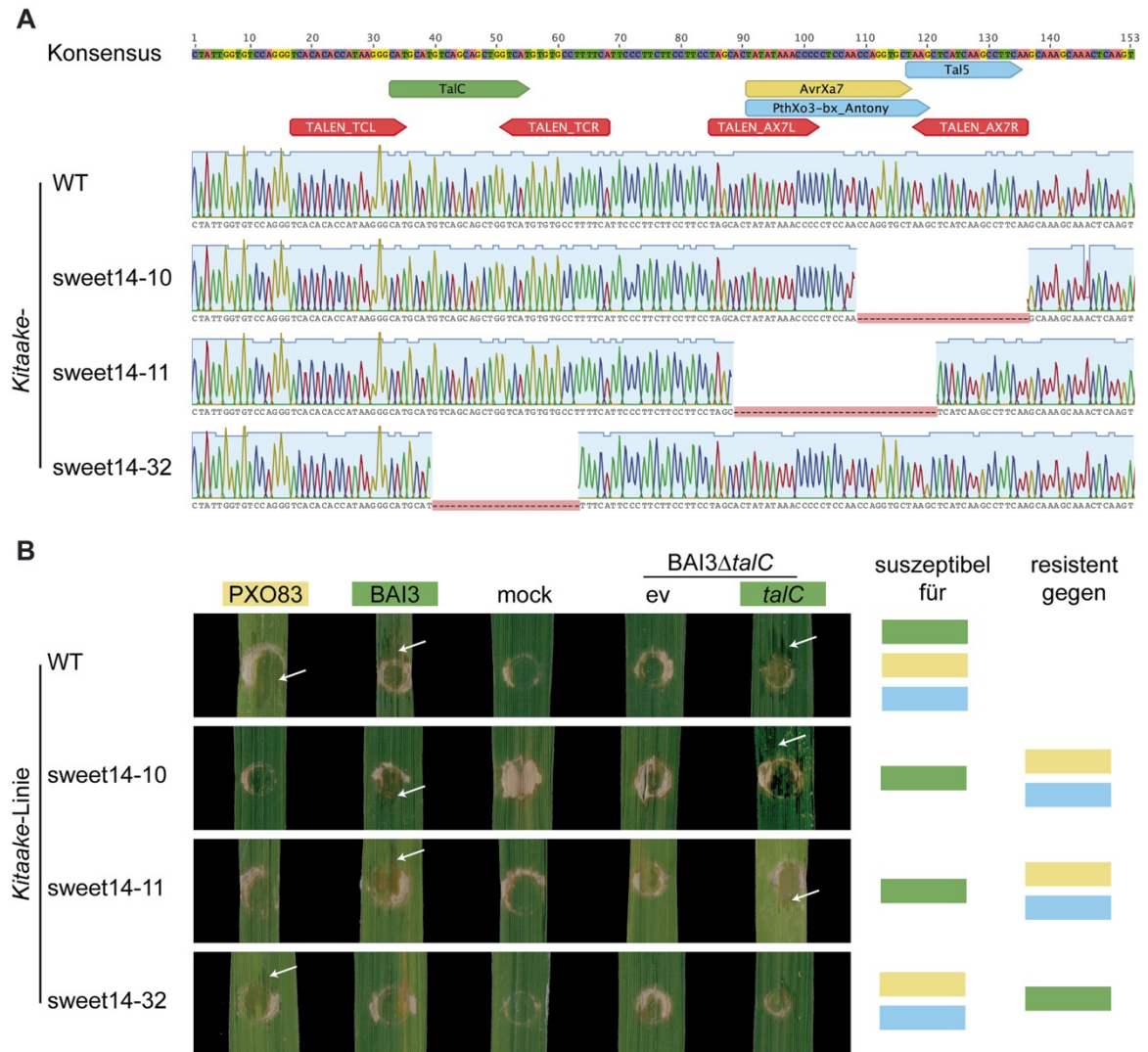


Abbildung 3.1.3 Analyse der resistenten Reispflanzen

A) Dargestellt ist ein 153bp großer Ausschnitt aus dem Promotor des Suszeptibilitätsgens *OsSWEET14*, in dem die natürlichen TALEs TalC (grün), Tal5 (blau, oben), AvrXa7 (gelb) und PthXo3 (blau, unten) sowie die erstellten TALEN-Paare TCL/TCR und Ax7L/Ax7R (rot) binden. Darunter sind die Sequenzierergebnisse verschiedener *Kitaake*-Linien (WT, sweet14-10, sweet14-11 und sweet14-32) dargestellt. Rote Striche bedeuten Deletionen im Vergleich zu der Konsensus-Sequenz. **B)** Analyse der Virulenzphänotypen nach Inokulation verschiedener *Xoo*-Stämme. Die *Xoo*-Stämme PXO83, BAI3, BAI3Δ*talC*+*ev*, sowie BAI3Δ*talC* mit dem TALE TalC wurden mittels Spritze und einer OD₆₀₀ von 0,5 in die vier verschiedenen Reislinien *Kitaake* WT, sweet14-10, sweet14-11 und sweet14-32 inokuliert. Pro Stamm wurden je zwei Blätter mit je 4-6 Inokulationspunkten versehen. 5 Tage nach Inokulation wurden die Virulenzphänotypen, sichtbar als dunkelgrüne wässrige Läsionen um den Inokulationspunkt (mit weißem Pfeil gekennzeichnet), ausgewertet und fotografiert. Dargestellt sind jeweils repräsentative Ausschnitte der inokulierten Blätter. Rechts neben den Virulenzphänotypen ist dargestellt, für welche *Xoo*-Stämme die einzelnen *Kitaake*-Linien suszeptibel oder resistent sind. Dabei entsprechen die Farben den Farben der TALEs in der Sequenz in A. Die Sequenzierung und Analyse der Virulenzphänotypen wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. WT – Wildtyp, ev – empty vector, mock – Inokulation nur mit MgCl₂.

Mit diesen Experimenten konnten zum einen die vorher beschriebenen Mutationen der drei editierten *Kitaake* Linien, sweet14-10, sweet14-11 und sweet14-32 bestätigt werden und zum anderen konnte mit Hilfe der Phänotypenanalyse gezeigt werden, dass die mutierten TALE-Boxen, im Promotorbereich von *OsSWEET14*, zu einem Verlust der

Virulenz von *Xoo* führen können und die Reislinien resistent gegenüber Infektionen von bestimmten *Xoo*-Stämmen sind.

3.2 Erstellung von *single-chain* TALEN

TALEN sind Fusionen aus einem TALE und der *FokI*-Nukleasedomäne. Um einen Doppelstrangbruch in die DNA einzufügen, muss *FokI* dimerisieren, weshalb TALEN immer als Paar eingesetzt werden (Abb. 1.4.3; Christian *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011; Malzahn *et al.*, 2017). Die Nutzung von zwei TALEN-Proteinen hat Vor- und Nachteile. Ein großer Vorteil ist, dass das Einfügen eines DSBs sehr spezifisch ist und das *off target*-Risiko minimiert wird. Nur wenn beide TALEN an der gewünschten Position die DNA binden, kann die katalytische Domäne von *FokI* dimerisieren und die DNA schneiden. Ein Nachteil ist, zwei Proteine klonieren zu müssen und vor allem in den Zielorganismus zu transformieren. Dies ist gerade dann relevant, wenn die erwartete Transformationseffizienz gering ist. Es gibt zwar die Möglichkeit zwei *talen*-Gene in ein Plasmid zu klonieren und mit einem *Agrobacterium*-Stamm zu transformieren, jedoch ist es in solch einer Konfiguration möglich, dass zwischen den beiden *talen*-Genen Rekombinationen stattfinden. Dies wiederum würde die *Genome Editing*-Effizienz verringern. Somit ist es nötig, zwei Plasmide mit je einem *talen*-Gen zu klonieren und, z.B. mittels zwei *Agrobacterium*-Stämmen, in den Zielorganismus zu transformieren. Aus diesen Gründen wurden sogenannte *single-chain* TALEN konstruiert und auf die Funktionalität zum *Genome Editing* getestet.

Zur Erstellung der *single-chain* TALEN (scTALEN) wurden zwei *FokI*-Monomere, getrennt durch einen flexiblen Linker, an einen TALE mit verkürztem N- und C-Terminus fusioniert (Abb. 3.2.1A). Eine *single-chain FokI*-Nuklease wurde bereits von Minczuk *et al.* im Jahr 2008 beschrieben. In dieser Studie wurden *single-chain* Zinkfinger-Nukleasen erstellt und deren Aktivität nachgewiesen (Minczuk *et al.*, 2008). Dabei wurden verschiedene Längen des flexiblen Linkers zwischen den *FokI* Monomeren getestet. Die höchste Effizienz erzielten die Autoren mit Linkern ab einer Länge von 30 Aminosäuren (Minczuk *et al.*, 2008).

Für die Konstruktion der scTALEN wurden drei verschiedene Linker analog zu der Studie von Minczuk *et al.* getestet. Dafür wurden drei verschiedene *Golden Gate*-Module, bestehend aus einem verkürzten C-Terminus von Hax3, dem *FokI* Monomer *Sharkey* DS, einem flexiblen Linker mit 17, 30 oder 35 Aminosäuren Länge und dem *FokI* Monomer *Sharkey* RR, erstellt. Für die Erstellung der *Golden Gate*-Module wurden zunächst, ausgehend von den entsprechenden Templates, für den C-terminalen Bereich von Hax3, den *FokI*-Monomeren, PCR-Reaktionen gemacht. Diese wurden dann in einem zweiten Schritt mit Hilfe der „*splicing by overlapping PCR*“ Methode zusammengefügt und in den

Vektor pUC57 kloniert. Mit Hilfe von Primern wurden die *Bsa*I-Schnittstellen, die spezifischen Überhänge sowie die Linkersequenzen eingefügt. Es wurden *Fok*I Monomere verwendet die einen Heterodimer bilden und im Vergleich zum Wildtyp *Fok*I verschiedene Mutationen tragen. Diese Mutationen bewirken zum einen die Heterodimerisierung und zum anderen eine Aktivitätssteigerung im Vergleich zum Wildtyp *Fok*I (Guo *et al.*, 2010; Abb. 3.2.1B). Die neu erstellten scTALEN bestehen aus einer verkürzten N-terminalen Region von Hax3, bei dem die ersten 151 Aminosäuren deletiert wurden, einer *repeat*-Domäne zur DNA Bindung und dem C-terminalen *single-chain-Fok*I Modul (Abb. 3.2.1A).

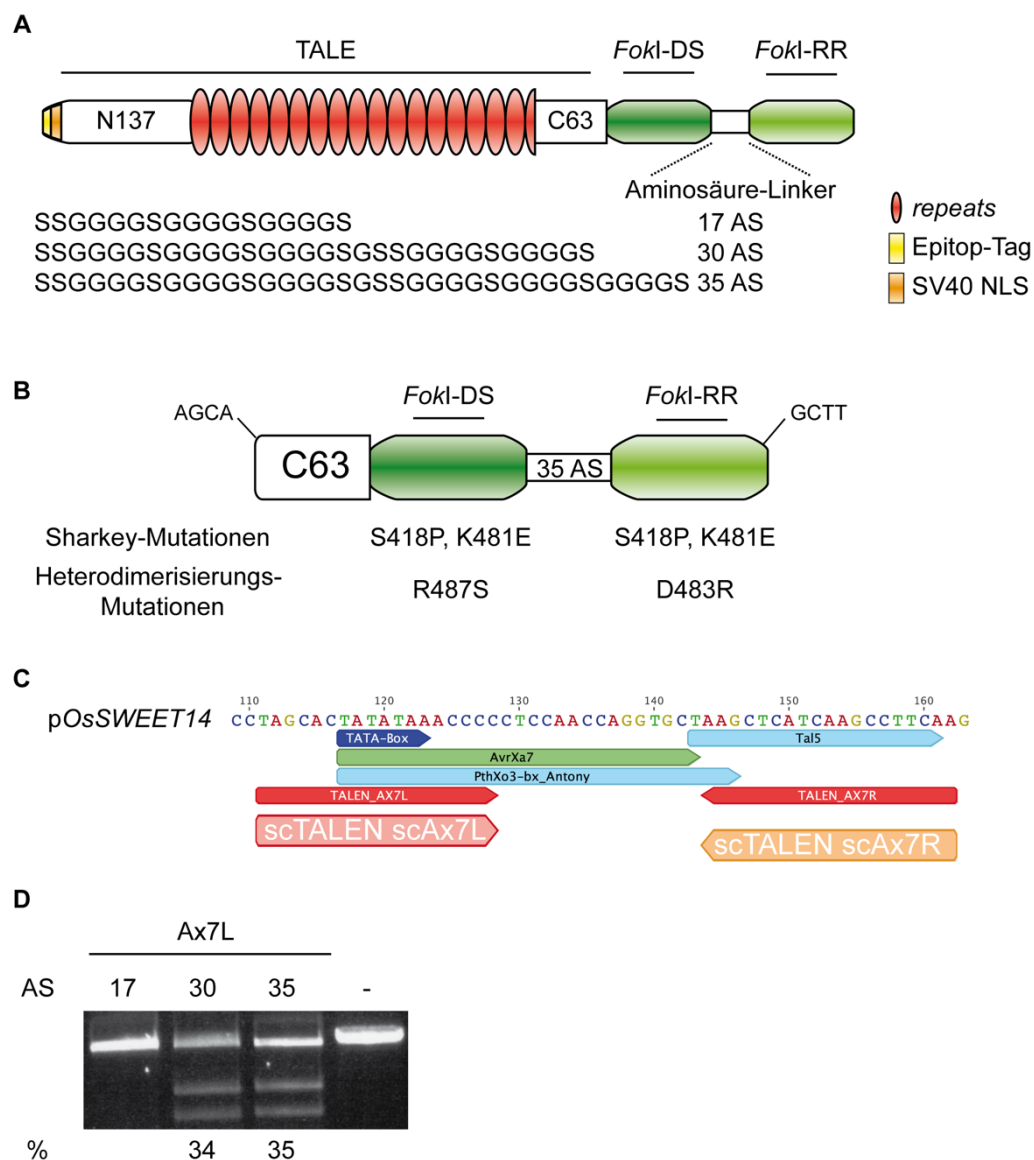


Abbildung 3.2.1 Analyse der Aktivität von scTALEN mit verschiedenen Linker-Längen mittels *in vitro* cleavage Assay.

A) Schematische Darstellung einer *single-chain* TALEN. Sie besteht aus einem TALE mit verkürztem N- und C-Terminus zur DNA Bindung und zwei *Fok*I-Monomeren, welche einen Heterodimer bilden, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind. Die Aminosäuresequenz der drei verschiedenen Linker ist im Ein-

Buchstaben-Code dargestellt. Die *forward* TALEN haben einen c-myc Epitop-Tag und die *reverse* TALEN haben einen HA-Epitop-Tag. **B**) Dargestellt ist das *Golden Gate* Modul H3C63scFok mit einem 35 AS Linker. Dieses Modul wurde für alle folgenden Experimente verwendet. Am 5´- bzw. 3´-Ende des Moduls sind die *BsaI*-Überhänge dargestellt. Unter dem *Golden Gate* Modul sind die Mutationen der beiden *FokI*-Monomere zu sehen. **C**) Dargestellt ist ein kleiner Ausschnitt des *OsSWEET14* Promotors. Die scTALEN scAx7L (hellrot) bindet die gleiche Sequenz im Promotor wie die *forward* TALEN Ax7L (rot). Die scTALEN scAx7R (hellorange) bindet die gleiche Sequenz wie die *reverse* TALEN Ax7R (rot). **D**) Ergebnis des *in vitro cleavage* Assays. Verglichen wurden die scTALEN scAx7L mit drei verschiedenen Aminosäure-Linkern 17AS, 30AS und 35 AS. Aktivität der scTALEN ist bei den Linkerlängen 30AS und 35AS zu erkennen. Die Effizienzen wurden mit Hilfe der Agarosegel-Bilder und der *mage Studio™ Lite* Software von LI-COR ermittelt. Als Kontrolle (-) wurde der lineare Reporter mitgeführt. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Als erstes wurden zwei scTALEN erstellt um, wie in Abschnitt 3.1, die Zielsequenz des natürlichen TALEs AvrXa7 zu mutieren. Dabei bindet die scAx7L die gleiche Sequenz wie die *forward* TALEN Ax7L und die scAx7R bindet die gleiche Sequenz wie die *reverse* TALEN Ax7R (Abb. 3.2.1C). In der Bezeichnung der scTALEN stehen die Zahlen 17, 30 oder 35 für die verwendete Linker-Länge. Ist keine Zahl an den Namen angehängt, so wurde der Linker mit 35 Aminosäuren Länge verwendet. Die scTALEN wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf ihre Aktivität DNA zu schneiden untersucht.

3.2.1 scTALEN schneiden DNA *in vitro*

Die Funktionalität der scTALEN wurde zunächst mit Hilfe eines *in vitro cleavage* Assays analysiert. Dazu sind die scTALEN unter Kontrolle eines T7-Promotors kloniert wurden. Dies ermöglicht die Produktion der Proteine *in vitro* unter Verwendung des *TnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System* von Promega. Die scTALEN-Proteine wurden dann zusammen mit einem linearisierten DNA-Fragment, welches als Reporter dient, bei 37°C inkubiert. Sind die scTALEN funktional, kann dies mittels Agarosegelelektrophorese, durch das Entstehen zweier zusätzlicher DNA-Fragmente, nachgewiesen werden.

Zuerst wurden die scTALEN Varianten mit den unterschiedlichen Linker-Längen von 17, 30 und 35 AS getestet. Es zeigte sich, dass nur die Varianten mit 30 bzw. 35 AS langen Linkern die DNA schneiden können (Abb. 3.2.1D). Für alle folgenden Experimente wurden alle weiteren scTALEN Konstrukte mit einem 35 AS langem Linker erstellt und genutzt.

Als nächstes wurden die scTALEN scAx7L35 im Vergleich zu dem TALEN Paar Ax7L/Ax7R getestet. Dazu wurde das TALEN Paar und die scTALEN mit linearisierter Ziel-DNA eine Stunde inkubiert (Abb. 3.2.2A). So konnte festgestellt werden, dass in Abhängigkeit von der Zeit die scTALEN Ax7L35 die DNA etwas effizienter schneidet als das TALEN Paar Ax7L/Ax7R (Abb. 3.2.2).

Zusätzlich wurde die Aktivität des TALEN Paares und der scTALEN im Verlauf der Zeit analysiert (Abb. 3.2.2B/C). Dazu wurde eine Zeitreihe erstellt, in der nach verschiedenen Zeitpunkten, zwischen 0 und 120 min Inkubation mit der linearen Ziel-DNA, Proben entnommen und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert wurden.

Anhand dieser Zeitreihe lässt sich feststellen, dass das TALEN Paar nach 5 Minuten mehr DNA geschnitten hat als die scTALEN. Von diesem Zeitpunkt an nimmt bei beiden die Menge an geschnittener DNA zu. Ab 30 Minuten Inkubationszeit ist die Effizienz der scTALEN Ax7L größer als die des TALEN Paares Ax7L/Ax7R. Nach 105 Minuten ist das Maximum an geschnittener DNA erreicht und fällt dann nach 120 Minuten leicht ab. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Proteine ab diesem Zeitpunkt nicht länger stabil sind. Somit stehen nach 105 Minuten womöglich weniger Nukleasen zur Verfügung um DNA zu schneiden. Zusammenfassend lässt sich im Vergleich der *in vitro* Aktivität zwischen TALEN Paar und scTALEN feststellen, dass die scTALEN Ax7L35 die DNA ein wenig effizienter als das TALEN Paar schneidet (Abb. 3.2.2B/C).

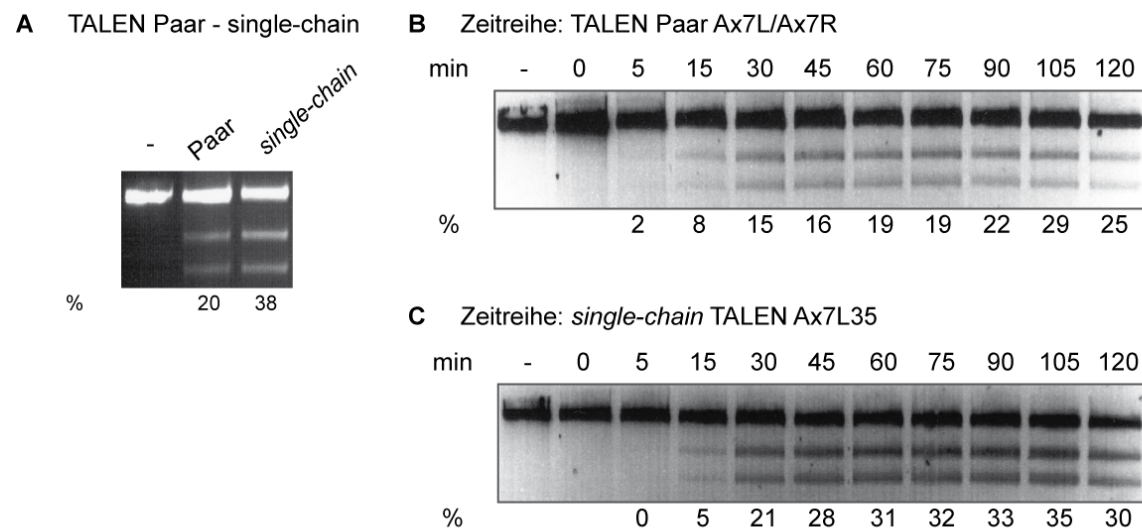


Abbildung 3.2.2 Vergleich der Aktivitäten von scTALEN und TALEN Paar mittels *in vitro* cleavage Assay

A) Ergebnis vom Vergleich eines TALEN Paares (Ax7L/Ax7R) mit einer scTALEN (scAx7L) im *in vitro* cleavage Assay. **B)** und **C)** Test der Aktivität von scTALEN und TALEN Paar im Verlauf der Zeit im *in vitro* cleavage Assay. Dafür wurden die TALEN- und scTALEN-Proteine *in vitro* exprimiert. Danach wurde ein *Master-Ansatz* für die DNA-Spaltung mit der gleichen Ziel-DNA erstellt und bei 37°C inkubiert. Danach wurden für die einzelnen Zeitpunkte Aliquots der Reaktion abgenommen und die Reaktion wurde durch Hitze inaktiviert. Nachdem alle Proben genommen wurden, wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Effizienzen wurden mit Hilfe der Agarosegel-Bilder und der *Image Studio™ Lite Software* von LI-COR ermittelt. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Um die Stabilität der Proteine im Verlauf der Zeit zu testen, wurden die scTALEN vor der Inkubation mit DNA, 30, 60 und 120 Minuten bei 37°C bzw. 180 Minuten auf Eis gelagert. Dabei lässt sich erkennen, dass die Aktivität bei einer Prä-Inkubation für 120 Minuten bei 37°C und 180 Minuten auf Eis stark abnimmt (Abb. 3.2.3A). Somit lässt sich sagen, dass die scTALEN Proteine nur eine bestimmte Zeit aktiv sind. Dies könnte an einer verminderten Stabilität der Proteine im Laufe der Zeit liegen.

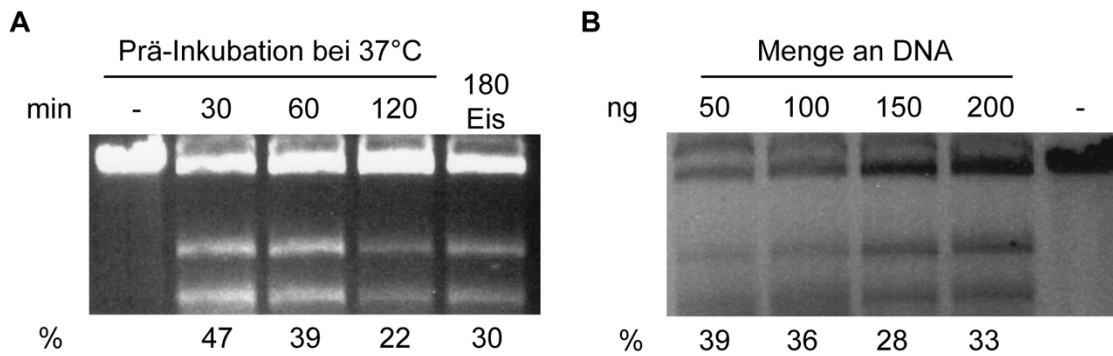


Abbildung 3.2.3 Analyse der Aktivität der scTALEN in Abhängigkeit einer Prä-Inkubation und Einfluss der Menge an eingesetzter DNA auf die Aktivität von scTALEN *in vitro*.

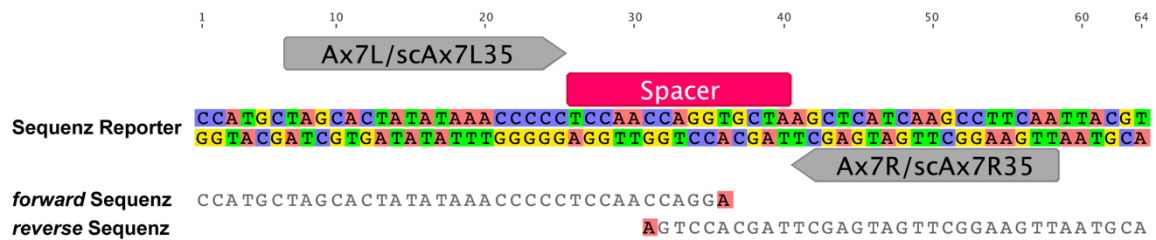
A) Bei diesem Assay wurde getestet, wie sich eine Prä-Inkubation der scTALEN scAx7L über 30, 60 und 120 min bei 37°C oder 180 min auf Eis, auf die Effizienz der Nuklease auswirkt. Dafür wurde die scTALEN scAx7L *in vitro* exprimiert. Danach wurden vier Aliquots für die einzelnen Proben erstellt. Drei wurden bei 37°C und eins auf Eis prä-inkubiert. Danach wurden die jeweiligen scTALEN für eine Stunde mit der linearisierten Ziel-DNA bei 37°C inkubiert und danach mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. **B)** Es wurde der Einfluss der Menge an DNA auf die Effizienz der scTALEN DNA zu schneiden untersucht. Verschiedene Mengen (50, 100, 150 oder 200ng) der Ziel-DNA wurden mit der scTALEN Ax7L eine Stunde bei 37°C inkubiert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass in diesem Assay auch eine geringere Menge an DNA nicht zum vollständigen Verdau der DNA führt. Als Kontrolle (-) wurde der lineare Reporter mitgeführt. Die Effizienzen wurden mit Hilfe der Agarosegel-Bilder und der *Image Studio™ Lite Software* von LI-COR ermittelt.

Des Weiteren wurde getestet ob es eine DNA-Konzentration gibt, bei der die gesamte Ziel-DNA von den scTALEN geschnitten wird. Nach Inkubation der scTALEN Ax7L35 mit 50, 100, 150 oder 200ng DNA konnte festgestellt werden, dass die eingesetzte Menge an DNA nur einen geringen Einfluss auf die Menge an geschnittener DNA besitzt (Abb. 3.2.3B). Mit den getesteten Mengen konnten zwischen 28% und 39% der DNA geschnitten werden. Somit konnte in diesem Experiment keine DNA-Konzentration ermittelt werden, bei der die gesamte eingesetzte DNA geschnitten wird.

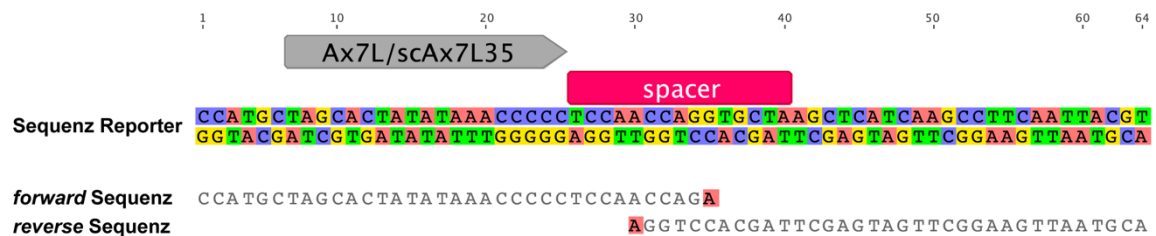
Um vergleichen zu können ob sich die scTALEN Ax7L35, Ax7R35 und das TALEN Paar Ax7L/R im Hinblick auf den Schnittpunkt der DNA unterscheiden, wurde dieser mit Hilfe eines *in vitro cleavage Assays* analysiert. Dazu wurden die beiden DNA Fragmente, die durch den Schnitt der TALEN entstehen, aus dem Agarosegel gereinigt und sequenziert. Die ermittelten Schnittpunkte des TALEN Paares und der scTALEN scAx7L35 werden ausgehend von der letzten Base der *forward* TALE-Bindestelle angegeben. Der ermittelte Schnittpunkt der scTALEN scAx7R35 wird ausgehend von der letzten Base der *reverse* TALE-Bindestelle angegeben. Das TALEN Paar, bei dem die beiden Zielsequenzen durch einen 15bp langen *Spacer*-Bereich getrennt sind, schneidet die Ziel-DNA auf dem *reverse* Strang nach bp und den *forward* Strang nach 10bp (Abb. 3.2.4A). Somit produziert das TALEN Paar, wie für die *FokI*-Nukleasedomäne erwartet, einen 4bp Überhang, in diesem Fall CAGG (Abb. 3.2.4A). Dieser Schnittpunkt könnte jedoch von der Länge des gewählten *Spacer*-Bereichs abhängen. Die *forward* scTALEN scAx7L35 schneidet den *reverse* Strang nach 5bp und den *forward* Strang nach 9bp (Abb. 3.2.4B). Somit entsteht ein

CCAG Überhang (Abb. 3.2.4B). Die *reverse* scTALEN scAx7R35 schneidet den *reverse* Strang nach 9bp und den *forward* Strang nach 5bp (Abb. 3.2.4C). Dabei entsteht der 4bp Überhang CAGG (Abb. 3.2.4C). Bei den *single-chain* TALEN ist der bestimmte Schnittpunkt unabhängig von einem *Spacer*-Bereich zu betrachten. Beide scTALEN schneiden die DNA mit dem selben Abstand von der jeweiligen TALE-Bindestelle.

A Schnittpunkt TALEN Paar



B Schnittpunkt scAx7L35



C Schnittpunkt scAx7R35

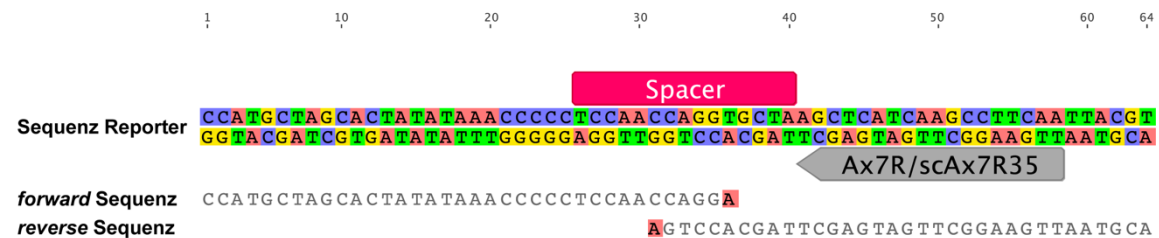


Abbildung 3.2.4 Analyse der Aktivität Schnittpunkte von scTALEN *in vitro*.

Dargestellt sind die *in vitro* ermittelten Schnittpunkte der Nucleasen. Dafür wurden die Nucleasen *in vitro* exprimiert und zusammen mit der Ziel-DNA für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen DNA-Fragmente mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die zusätzlich durch die DNA-Spaltung entstandenen DNA-Fragmente wurden aus dem Gel isoliert und sequenziert. Ein zusätzliches Adenin (rot hinterlegt) wird bei der Sequenzierreaktion durch die *Taq*-Polymerase angehängt und gehört nicht zur eigentlichen Sequenz. **A)** Schnittpunkt des TALEN Paares Ax7L/Ax7R mit Überhang 5'-CAGG-3'. **B)** Schnittpunkt scTALEN scAx7L35 mit Überhang 5'-CCAG-3'. **C)** Schnittpunkt scTALEN scAx7R35 mit Überhang 5'-CAGG-3'.

3.2.2 Funktionalität der scTALEN *in vivo*

Um die Nukleaseaktivität der TALEN in pflanzlichen Zellen zu analysieren, wurde ein transienter GUS-Reporterassay (GUS: β -Glucuronidase) in der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* angepasst und ein GUS-*out-of-frame*-Reporterkonstrukt (GUS-*oof*-Reporter) verwendet (Reschke, 2012). In diesem liegt das β -Glucuronidase-Gen (*uidA*) unter Kontrolle eines konstitutiven 35S-Promotors vor. Zwischen dem Startcodon und dem offenen Leserahmen des Reportergens *uidA* wurden 52bp inseriert, die die Zielsequenz

des TALEN Paares Ax7L und Ax7R getrennt durch einen 15bp Spacer enthalten (Abb. 3.2.5A). Durch diese Insertion verschiebt sich der Leserahmen und es wird keine funktionale β -Glucuronidase produziert. Sind TALEN präsent, binden diese an ihre Zielsequenzen, die *FokI*-Domänen dimerisieren und fügen einen DSB ein. Dieser DSB wird mit Hilfe der zelleigenen Reparaturmaschinerie durch *non-homologous end joining* (NHEJ) oder durch *homology-directed repair* (HDR) repariert (Pastwa & Błasiak, 2003; Puchta, 2004; Lieber, 2010; Steinert *et al.*, 2016). In den meisten Fällen kommt der Mechanismus des NHEJ zum Einsatz, bei dem die offenen Enden bereinigt und der DNA Doppelstrang ligiert wird. Dabei kommt es oftmals zu kleinen Insertionen, Deletionen oder einer Mischung aus beidem (InDel). Durch diese Mutationen kann der richtige Leserahmen des GUS-Reportergens zufällig wiederhergestellt und funktionale β -Glucuronidase produziert werden (Abb. 3.2.5A). Die Aktivität der β -Glucuronidase kann anschließend anhand der Umsetzung eines Substrates gemessen werden.

Zur Analyse der Nuklease-Aktivität wurden entweder das TALEN Paar Ax7L/Ax7R oder eine der scTALEN scAx7L bzw. scAx7R zusammen mit dem GUS-*oof*-Reporterkonstrukt *Agrobacterium*-abhängig in *N. benthamiana* transferiert. Die Produktion funktionaler β -Glucuronidase kann dann mittels quantitativer β -Glucuronidase (GUS)-Messung analysiert werden. Es konnte festgestellt werden, dass nur bei dem TALEN Paar GUS-Aktivität messbar ist. Bei den beiden scTALEN konnte keine GUS-Aktivität gemessen werden (Abb. 3.2.5B). Dies lässt darauf schließen, dass ausschließlich das TALEN Paar einen DSB *in vivo* einfügen konnte.

Dieses Ergebnis war unerwartet, da die scTALEN im Vergleich zum TALEN Paar *in vitro* mit leicht höherer Effizienz schneiden (Abb. 3.2.2). Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen könnte es sein, dass die scTALEN in den pflanzlichen Zellen nicht exprimiert oder die Proteine nach der Expression abgebaut werden. Um dies zu testen, wurde mit Hilfe eines Western-Blots die Expression der Nukleasen analysiert. Es wurde mit der *forward* TALEN des Paares (Ax7L) und der *forward* scTALEN (scAx7L35) eine Western Zeitreihe durchgeführt. Dafür wurden die jeweiligen Konstrukte mit Hilfe von *Agrobacterium* in *N. benthamiana* exprimiert und alle zwölf Stunden Proben genommen. Diese Proben wurden dann zeitgleich aufgearbeitet und die Expression der Nukleasen mittels Western-Blot untersucht (Abb. 3.2.5C/D). Es konnte festgestellt werden, dass die ersten Signale von TALEN-Proteinen nach 36 Stunden zu erkennen sind (Abb. 3.2.5C/D). Die Expression der Proteine beginnt somit zwischen 24 und 36 Stunden nach der Inokulation. Weiterhin ist zu erkennen, dass bei der TALEN Ax7L ein Signal auf der erwarteten Höhe von circa 135 kDA nachweisbar ist (Abb; 3.2.5C). Bei der scTALEN scAx7L35 hingegen ist kein Signal auf der erwarteten Höhe von circa 155 kDA erkennbar

(Abb. 3.2.5D). Jedoch kann man ein Signal mit einer ungefähren Größe von 135 kDA erkennen. Dies würde einer normalen TALEN entsprechen. Bei beiden Nukleasen sind zusätzliche Signale erkennbar, welche auf C-terminalen Abbau der Proteine hindeuten, da ein GFP-Antikörper für den N-terminalen GFP Epitop-Tag verwendet wurde. Zusammenfassend kann die korrekte Expression der scTALEN in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden. So ist es möglich, dass die scTALEN-Proteine in der Pflanzenzelle nicht stabil sind und somit eventuell auch nicht aktiv sein können.

Eine weitere Erklärung dafür, dass die scTALEN mit dem GUS-*oof*-Reporter keine Aktivität zeigen, ist die unterschiedliche Funktionsweise. Der wesentliche Unterschied zwischen dem TALEN Paar und den scTALEN liegt darin, dass das TALEN Paar einen bestimmten *Spacer*-Bereich benötigt um die DNA zu schneiden. Nachdem das TALEN Paar einen DSB im *Spacer*-Bereich eingefügt hat und dieser repariert wurde, kann sich dessen Größe und damit der Abstand der beiden TALEN zueinander verändern, sodass das TALEN Paar meist nicht erneut schneiden kann. Somit kommt es zu einer Akkumulation der Mutationen und es kann GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Die scTALEN sind nicht auf einen *Spacer*-Bereich angewiesen. Somit ist es möglich, dass die scTALEN an die DNA binden und einen DSB einfügen, sich von der DNA lösen und danach wieder an die DNA binden und erneut schneiden. Dies könnte kontinuierlich so weiter gehen bis die scTALEN Bindestelle mutiert ist und die scTALEN nicht mehr an die DNA binden können. So könnte es sein, dass es nicht zu einer Mutation kommt, bei der GUS-Aktivität nachgewiesen werden kann. Diese Theorie wurde mittels *in vivo* Deletions-Assay überprüft.

Als erstes wurde mit Hilfe des GUS-*oof*-Reporters ein Deletions-Assay durchgeführt. Dazu wurden beide scTALEN Ax7L35 und Ax7R35 zusammen mit dem GUS-*oof*-Reporter inokuliert. Wenn beide scTALEN den Reporter schneiden und somit zwei DSBs einfügen, könnten Basen um die Schnittpunkte deletiert werden. Es ist manchmal zu beobachten, dass an der Stelle des DSBs zufällig verschieden große Deletionen entstehen. Betrifft die Deletion, in dem Reporter, die scTALEN Bindestellen, könnte so eine Mutation herbeigeführt werden, welche mit der Messung der GUS-Aktivität nachgewiesen werden kann. In Abbildung 3.2.6 ist zu erkennen, dass sowohl bei dem TALEN Paar (Ax7L/Ax7R), als auch bei beiden scTALEN (scAx7L + scAx7R) GUS-Aktivität messbar ist. Dies könnte bedeuten, dass die scTALEN funktional sind und zwei DSB einfügen. Es ist auszuschließen, dass die scTALEN durch die Pflanzenzelle teilweise abgebaut werden und dadurch als TALEN Paar an die DNA binden und einen DSB einfügen. Denn sowohl bei dem TALEN Paar als auch bei den scTALEN werden heterodimerisierende *FokI*-Varianten, *Sharkey FokI*-DS und *FokI*-RR, genutzt (Abb. 3.2.6A).

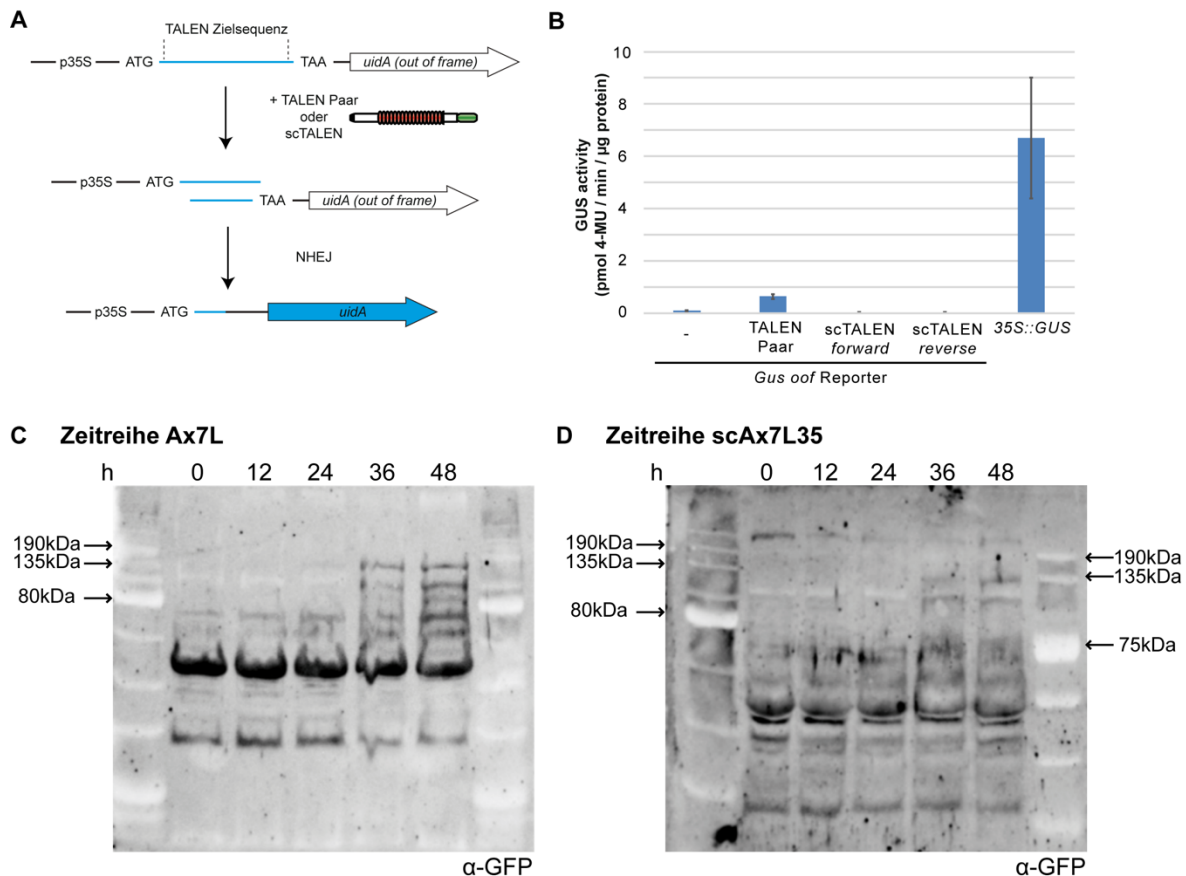


Abbildung 3.2.5 Analyse der Aktivität von scTALEN *in vivo* mit Hilfe eines GUS-Rekonstitutions-Assays.

A) Schematische Darstellung des GUS-*oof*-Reporters sowie dessen Funktionsweise. Zwischen das Startcodon und den Leserahmen des *uidA*-Gens wurde die Zielsequenz der TALEN kloniert womit das Reporter gen nicht mehr im richtigen Leserahmen ist. Wird nun ein DSB eingefügt, kann dieser über NHEJ repariert werden, wobei es zu InDel Mutationen kommt und somit zu einer Leserahmenverschiebung. Das Reporter gen *uidA* steht unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors. **B)** Test der scTALEN Konstrukte im GUS-Assay. Die Messung der TALEN-abhängigen Rekonstitution des Reporter gens erfolgte nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Expression der TALENs/scTALENs und des GUS-*oof*-Reporterkonstrukts in *N. benthamiana*. Dazu wurden die TALEN-Konstrukte, deren Expression durch den konstitutiven Promotor 35S kontrolliert wird, sowie das Reporterkonstrukt via *Agrobacterium tumefaciens* mit einer finalen OD₆₀₀ von jeweils 0,3 ko-inokuliert und 2dpi die Aktivität des Reporter gens bestimmt. Als Negativkontrolle diente der GUS-*oof*-Reporter alleine. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (n=3). 4-MU=4- Methylumbeliferon. **C)** und **D)** Zeitreihe der *in planta* Expression der *forward* TALEN Ax7L (C) und *forward* scTALEN scAx7L35 (D). Die TALEN Ax7L und die scTALEN scAx7L35 wurden getrennt voneinander *Agrobacterium*-vermittelt in Blättern von *N. benthamiana* exprimiert. Nach 0, 12, 24, 36 und 48 Stunden wurden Proben geerntet und mit Hilfe eines Western-Blots analysiert. Die TALEN-Proteine wurden mit Hilfe ihres GFP Epitop-Tags und einem entsprechenden Antikörper detektiert. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Werden die scTALEN vom C-terminalen Ende her abgebaut, hätte man dann zweimal eine TALEN mit der *FokI*-DS Variante (Abb. 3.2.6C). Diese zwei *FokI* Monomere können nicht dimerisieren und somit keinen DSB einfügen. Wenn die scTALEN scAx7L35 vom C-terminalen Ende abgebaut wird, hätte man allerdings die passende *forward* TALEN zu der TALEN Ax7R und es könnte ein DSB eingefügt werden. Um diese Möglichkeit zu testen wurden *Agrobacterium*-Stämme mit dem *forward* scTALEN-Konstrukt scAx7L35 zusammen mit *Agrobacterium*-Stämmen mit dem *reverse* TALEN-Konstrukt Ax7R (welche

die *FokI*-Variante RR besitzt, Abb. 3.1.1B) des Paares ko-inokuliert. Wie in Abbildung 3.2.6 zu erkennen ist, konnte bei dieser Kombination keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zusammen mit der Western-Blot Analyse lässt vermuten, dass sehr geringe Mengen der scTALEN in der Pflanzenzelle vorhanden sind. Diese geringen Mengen sind mit Hilfe der Western Blot-Analyse nicht nachweisbar. Es scheint jedoch so, dass intaktes Protein vorhanden ist, da bei Kombination von scAx7L35 mit scAx7R35 GUS-Aktivität messbar ist (Abb. 3.2.6). Es bleibt jedoch unklar wieso bei dem Test von beiden scTALEN zusammen GUS-Aktivität messbar ist.

Als nächstes sollten die scTALEN an einem Endogen getestet werden. Es sollte eine Deletions-Assay in der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* durchgeführt werden. Dafür wurde das Gen, welches für die Phytoen-Desaturase (*NbPDS*) kodiert, gewählt. In der Studie von Nekrasov *et al.* 2013 konnte mit Hilfe von CRISPR/Cas9 in diesem Gen eine Deletion eingefügt und mittels eines AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) Assays nachgewiesen werden. Diese Konstrukte dienten für den Test mit den scTALEN als Positivkontrolle. Um die scTALEN auf ihre Fähigkeit zu testen das Endogen zu schneiden und eine Deletion herbeizuführen, wurden die scTALEN-Konstrukte sowie die Cas9 und *single guide* RNA-Konstrukte mittels *Agrobacterium* transient in *N. benthamiana* exprimiert. Zwei Tage nach Inokulation wurden Proben geerntet, genomische DNA extrahiert und über PCR ein 542bp großes Fragment amplifiziert. Sind die Nukleasen funktional und fügen DSB ein, ist es möglich, dass der zwischen den DSB liegende genomische Bereich deletiert wird. Somit sollte ein zusätzliches kleineres Fragment, von ca. 470bp Größe, amplifiziert werden können (Abb. 3.2.7B).

Abbildung 3.2.7A zeigt einen Ausschnitt des *PDS*-Gens. Zu sehen sind die Lage der *single guide* RNAs (sgRNA) von Nekrasov *et al.*, 2013, die Lage der scTALEN scPDS10-13 sowie die Lage der Primer mit denen ein Fragment des Gens amplifiziert wurde. Die scTALEN scPDS10-13 unterscheiden sich lediglich in ihrer Zielsequenz und Orientierung. Dabei wurden die Zielsequenzen so gelegt, dass sie in der unmittelbaren Nähe der Zielsequenzen der sgRNAs von Nekrasov *et al.*, 2013 liegen. Somit sollte die Möglichkeit, dass die scTALEN-Zielsequenzen durch pflanzliche Proteine unzugänglich sind, minimiert werden. Es wurden vier verschiedene scTALEN konstruiert, um verschiedene Kombinationen zu testen. Das Ergebnis des Deletions-Assays ist in Abbildung 3.2.7C zu sehen. Bei der Positivkontrolle, den beiden sgRNAs und Cas9, wurde zusätzlich zu dem 542bp Fragment ein 470bp Fragment amplifiziert. Somit wurden durch die sgRNAs und die Cas9 zwei DSB eingefügt und die dazwischenliegende genomische DNA deletiert. Für alle Proben mit unterschiedlichen scTALEN-Kombinationen konnte kein zusätzliches kleineres Amplikon nachgewiesen werden. Somit konnten in diesem Ansatz keine nachweisbaren DSB generiert werden.

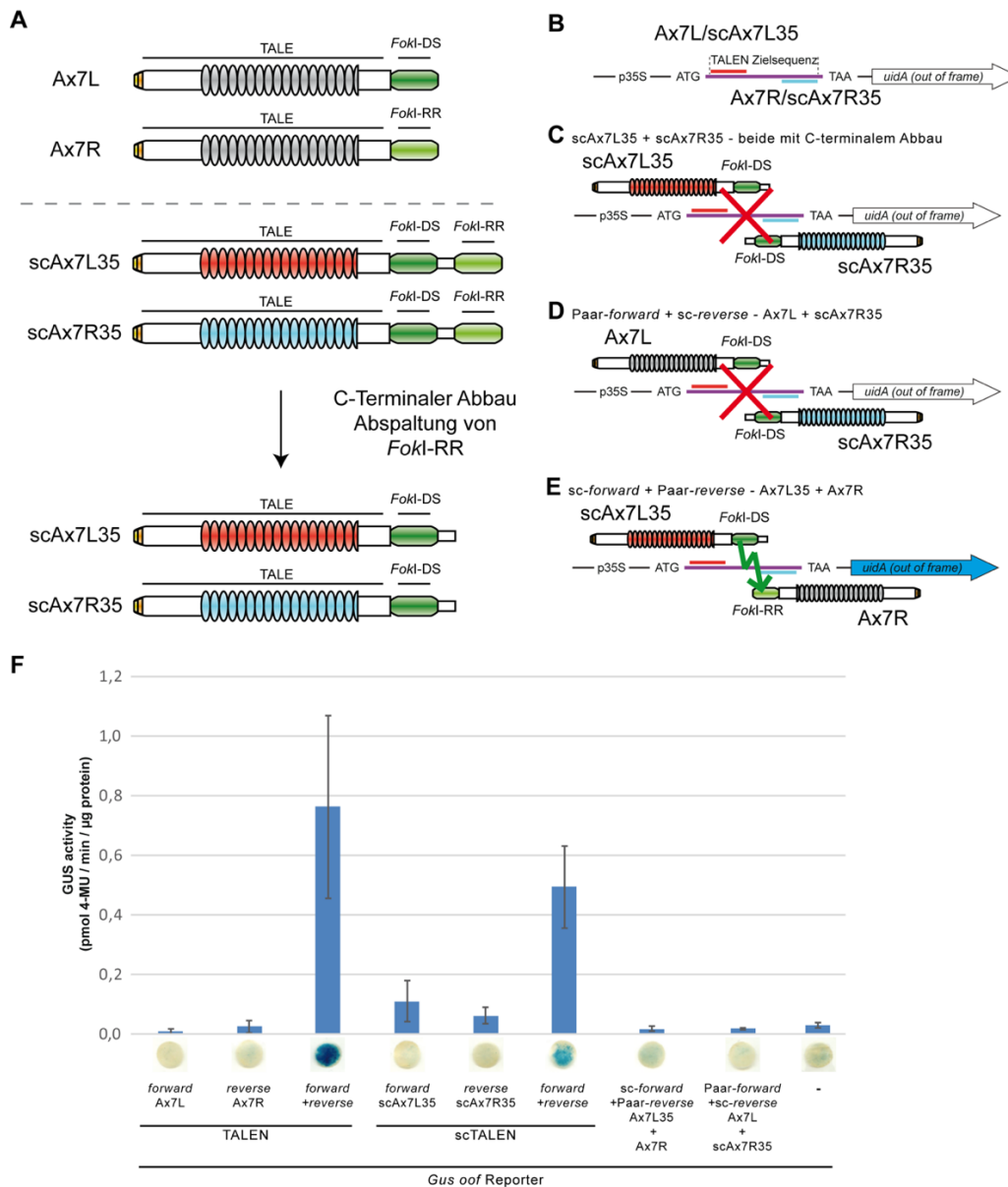


Abbildung 3.2.6 scTALEN-Aktivität im GUS-Rekonstitutions-Assay.

A) Schematische Darstellung der TALEN (oben) und scTALEN-Konstrukte (unten), sowie mögliche Kombinationen, welche durch partiellen Abbau der scTALEN-Proteine entstehen können. **B**) Schematische Darstellung des GUS-*oof*-Reporters. Eingezeichnet sind die Bindestellen für die TALENs bzw. scTALENs Ax7L und scAx7L35 (rot) sowie Ax7R und scAx7R35 in „normaler“ TALEN-Konfiguration durch C-terminalen Abbau. Geht man von C-terminalen Abbau der scTALEN aus und dass ein FokI-Monomer abgespalten wird, so würde man je eine scTALEN mit dem FokI-Monomer Sharkey DS erhalten. Binden beide scTALEN, können diese keinen funktionalen FokI-Dimer bilden und die DNA kann nicht gespalten werden. **D**) Kombiniert man die *forward* TALEN des Paares Ax7L mit der abgebauten *reverse* TALEN scAx7R35, treffen wieder zwei FokI-DS Monomere aufeinander und es kann kein Dimer gebildet werden. **E**) Ist die Theorie des C-terminalen Abbaus richtig, so müsste die *forward* scTALEN nur das FokI-DS Monomer besitzen. Kombiniert man diese nun mit der *reverse* TALEN des Paares Ax7R, so würden die FokI-Monomere DS und RR aufeinandertreffen und es könnte ein funktionaler Dimer gebildet und der GUS-*oof*-Reporter geschnitten werden und so das Reportergen wiederherstellen. **F**) Die Messung der TALEN-abhängigen Rekonstitution des Reportergens erfolgte nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Expression der TALENs/scTALENs und des GUS-*oof*-Reporterkonstrukts in *N. benthamiana*. Dazu wurden *Agrobacterium*-Stämme mit den TALEN-Konstrukten, deren Expression durch den konstitutiven Promotor 35S kontrolliert wird, sowie *Agrobacterium*-Stämme mit dem Reporterkonstrukt mit einer finalen OD₆₀₀ von jeweils 0,3 ko-inokuliert und 2dpi die Aktivität des Reportergens bestimmt. Als Negativkontrolle diente der GUS-*oof*-Reporter alleine. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (n=3). 4-MU=4-Methylumbeliferon. Als Negativkontrollen wurden jeweils die TALENs Ax7L oder Ax7R allein mit dem Reporter und der GUS-*oof*-Reporter alleine getestet. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass erfolgreich scTALEN kloniert werden konnten. Des Weiteren sind die erstellten scTALEN-Konstrukte *in vitro* aktiv und schneiden die Ziel-DNA an der gewünschten Stelle. Die Aktivität *in vivo* konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Nur in dem Experiment, bei dem beide scTALEN zusammen mit dem GUS-*oof*-Reporter getestet wurden, konnte GUS-Aktivität und somit Aktivität der scTALEN-Konstrukte gemessen werden. Der Mechanismus, wie diese Aktivität zu Stande kommt, bleibt allerdings unklar.

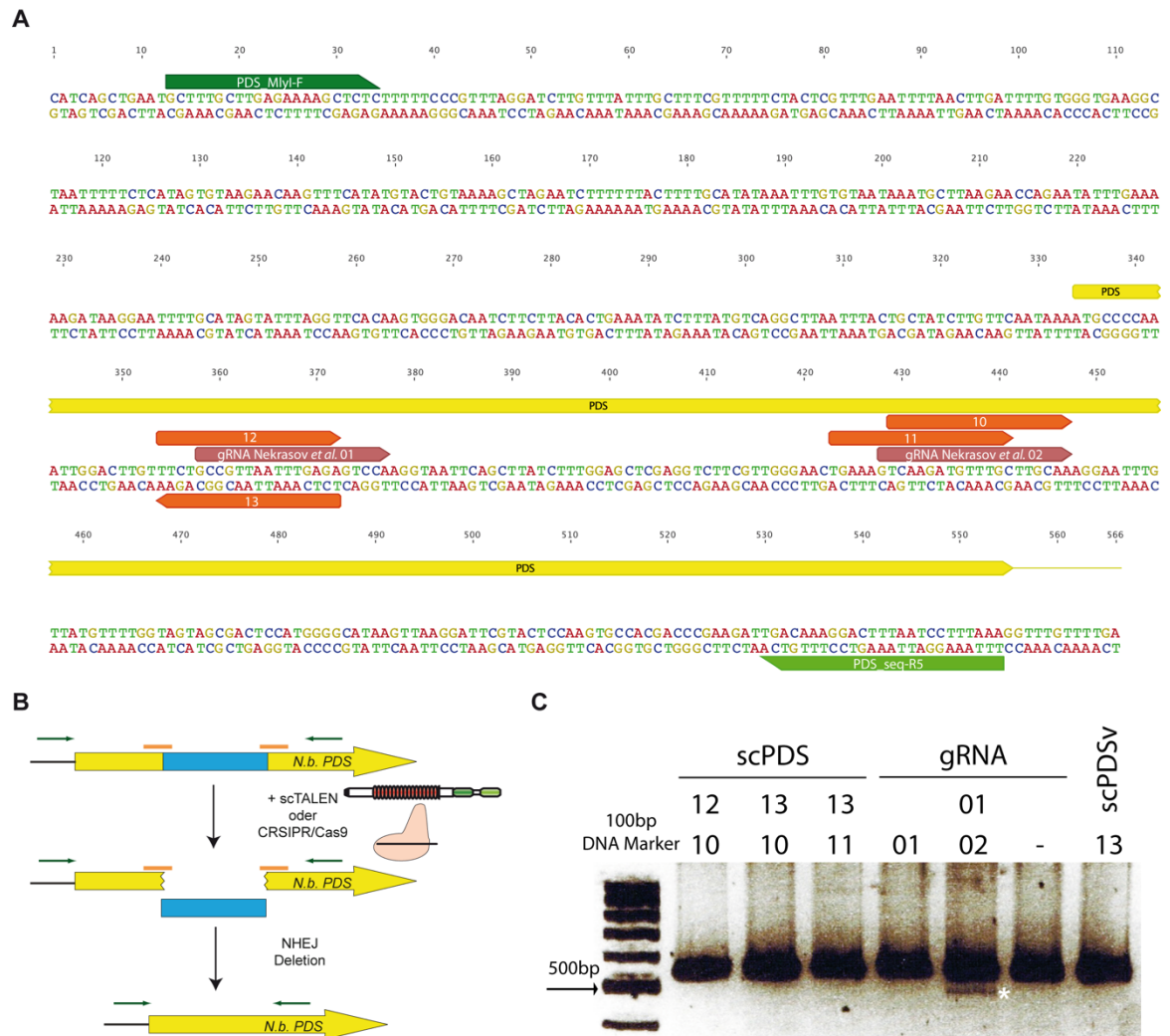


Abbildung 3.2.7 Analyse der Fähigkeit von scTALEN genomische Deletionen zu erzeugen mit Hilfe eines AFLP Assays.

A) Ausschnitt des *Phytoen-Desaturase* (PDS) Gens von *N. benthamiana*. Grün= Primer, rot= Lage der *guide* RNAs, orange= Lage der scTALEN, gelb= kodierende Sequenz. **B)** Schematische Darstellung der genomischen Deletion durch TALEN oder CRISPR/Cas9. **C)** Agarosegel des AFLP Assays. Die scTALEN-Konstrukte, sowie die Cas9 und *single guide* RNA-Konstrukte, wurden mittels *Agrobacterium* transient in *N. benthamiana* exprimiert. Zwei Tage nach Inokulation wurden Proben geerntet, genomische DNA extrahiert und mit dem Primer PDS_Myl-F und PDS_seqR5 wurde ein 542bp großes Fragment amplifiziert. Das zu erwartende Deletions-Fragment sollte eine Größe von ca. 470bp aufweisen. Als Negativkontrolle wurde das Cas9-Protein ohne sgRNA und die scPDS13 alleine in *N. benthamiana* exprimiert. Das Experiment wurde

dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Die Zahlen über den DNA-Spuren stehen für die getesteten scTALEN bzw. *single guide* RNA-Konstrukte, welche in A dargestellt sind.

3.3 Identifizierung neuer Zielgene von *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TALEs

Xanthomonas oryzae Spezies besitzen eine große Anzahl an TAL-Effektoren (TALE) von bis zu über 20 TALEs pro Stamm. Nur von einigen sind die Gene, die von den TALEs in der pflanzlichen Zelle aktiviert werden, bekannt. Pro *Xoo*-Stamm gibt es zu meist einen TALE, welcher als Schlüssel-Virulenzfaktor bezeichnet werden kann. So stellt sich die Frage, welche Zielgene haben die anderen TALEs und welche Rolle spielen diese für die Virulenz von *Xoo*. Um dies herauszufinden muss es als erstes möglich sein, potentielle Bindestellen von TALEs in einer Zielsequenz, wie zum Beispiel dem Reisgenom, vorherzusagen zu können. Des Weiteren benötigt man Informationen über das TALE Repertoire eines *Xoo*-Stammes, die RVD Sequenzen dieser TALEs, sowie Expressionsdaten von Reis infiziert mit einem *Xoo*-Stamm und uninferiert.

3.3.1 Vorhersage potentieller Zielgene von *Xanthomonas* TALEs mit Hilfe von TALgetter

Mit der Entschlüsselung des TALE-Codes im Jahr 2009 ist es möglich, von der RVD-Sequenz eines TALEs die DNA-Sequenz, die er bindet, abzuleiten (Boch *et al.*, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). Auf dieser Grundlage basierend war es nun bioinformatisch möglich, Vorhersageprogramme zu generieren. Zusammen mit unserem Kooperationspartner Dr. Jan Grau wurde das Vorhersageprogramm TALgetter geschaffen (Grau *et al.*, 2013). Das Programm wurde von Dr. Jan Grau programmiert und uns für unsere Arbeit zur Verfügung gestellt. Zum besseren Verständnis meiner Ergebnisse in 3.3.1.1. und 3.3.5 wird im Folgenden kurz auf das Programm TALgetter eingegangen.

TALgetter ist ein Werkzeug, um in einer gegebenen Sequenz anhand der RVD-Sequenz eines TALEs, potentielle Bindestellen zu finden. Das Programm arbeitet mit einer „*local mixture matrix*“ bei dem, im Gegensatz zu anderen Vorhersageprogrammen, sowohl die Bindespezifität als auch die Wichtigkeit der RVDs betrachtet wird. Die Parameter, mit welchen die Bindestellen gesucht werden, wurden mit Hilfe von Trainingsdaten erzeugt. Als Trainingsdaten dienten dabei TALEs von denen die Bindestelle und das Zielgen bereits bekannt waren, sowie verschiedene öffentlich zugängliche Gen-Expressions-Studien. Dadurch ist TALgetter leicht adaptierbar wenn neue Daten vorhanden sind (Grau *et al.*, 2013).

Anhand der Trainingsdaten (TALEs mit bekannter Bindestelle) war es möglich, die RVD Bindespezifitäten zu bestätigen. Außerdem kann den Daten entnommen werden, dass verschiedene RVDs unterschiedlich zur Aktivierung eines Gens beitragen (Grau *et al.*, 2013). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von Streubel *et al.* 2012. Weitere

Analysen zeigen, dass die meisten natürlichen TALEs eine Bindestelle im Bereich von +300bp bis -200bp vom Transkriptionsstart entfernt besitzen. Berücksichtigt man diese Positions-Präferenz, so kann man die Vorhersage von potentiellen Bindestellen verbessern, beziehungsweise anhand dieser Information, über die potentiellen Bindestellen, eine Vorauswahl treffen, welche hilft falsch-positive Vorhersagen zu reduzieren (Grau *et al.*, 2013).

Für den Nutzer ist die Bedienung von TALgetter relativ einfach gehalten. Man wählt zunächst das Datenset in welchem nach potentiellen Bindestellen gesucht werden soll, zum Beispiel das Promoterom von Reis. Als nächstes gibt man die RVD-Sequenz des TALEs in das entsprechende Feld ein. Nun kann TALgetter nach potentiellen Bindestellen suchen. Diese werden dann der Wahrscheinlichkeit nach geordnet, wobei Rang 1 die beste vorhergesagte Bindestelle ist.

3.3.1.1 Test der Funktionsweise von TALgetter

Um die korrekte Funktionsweise von TALgetter zu überprüfen, wurde experimentell getestet, ob die von TALgetter vorhergesagten Bindestellen wirklich von dem korrespondierenden TALE gebunden werden können. Dafür wurde der TALE AvrXa10 analysiert (Grau *et al.*, 2013). Für AvrXa10 wurde die Spezifität experimentell bestätigt, aber Ziel-Gene waren bisher nicht bekannt.

TAL-Effektor	Transkript	Annotation	Rang	Sequence	log fold-change	Experiment
AvrXa10	Os01g43280.1	hydroquinone glucosyltransferase, putative, expressed	6	TATATAAGCACGTAGCA	3,95	PXO86
AvrXa10	Os08g09010.1	Cupin domain containing protein, expressed	38	TATATAAGCACATCAAT	4,05	PXO86
AvrXa10	Os08g09040.1	Cupin domain containing protein, expressed	41	TATATAAACACATAAAT	4,54	PXO86
AvrXa10	Os12g28590.1	ATPase 2, putative, expressed	98	TAAACAAGCACATCC	2,76	PXO86
AvrXa10	Os07g49114.1	wound-induced protein WI12, putative, expressed	9	TATAAAAGCACGTCGCT	1,16	PXO86
AvrXa10	Os08g08960.1	Cupin domain containing protein, expressed	22	TATATAAGCACATCCAT	1,69	PXO86
AvrXa10	Os12g41110.1	OsCML5 - Calmodulin-related calcium sensor protein, expre	54	TATATAAGCACCCACCC	2,11	PXO86

Tabelle 3.3.1.1 Liste der sieben Gene, welche für AvrXa10 vorhergesagt wurden und in einem Microarray-Experiment mit PXO86 hochreguliert sind. In grün markiert sind die experimentell getesteten Boxen.

Als erstes wurde eine Vorhersage von Bindestellen für AvrXa10 im Reis-Promoterom durchgeführt und die Top100 Bindestellen bestimmt. Sieben Reisgene waren sowohl unter den Top100 Bindestellen von TALgetter als auch hochreguliert in Gen-Expressions-Studien (<http://www.plexdb.org>; Grau *et al.*, 2013, Tab. 2). Vier dieser potentiellen TALE Ziele (Tab. 3.3.1.1), welche auf den TALgetter Rängen 6, 38, 41 und 98 waren, wurden mit Hilfe einer Reportergergenstudie getestet. Dafür wurde die Bindestelle vor den minimalen *Bs4*-Promotor und ein promotorloses Reportergergen, *gusA*, kloniert und in einem transienten Assay in *N. benthamiana* getestet (Abb. 3.3.1.1). Drei der vier getesteten Bindestellen lösen eine AvrXa10 abhängige Aktivierung des Reportergergens aus. Diese sind die

vergleichbares Set an TALEs besitzen. Dafür sollten drei philippinische *Xoo*-Stämme PXO35, PXO83 und PXO142 sowie ein indischer *Xoo*-Stamm ICMP3125 mit Hilfe der SMRT-Sequenzierung (PacBio-Sequenzierung) sequenziert werden. Diese relativ neue Sequenzieretechnik zeichnet sich durch besonders lange *read*-Längen und eine hohe Sequenziertiefe (*coverage*) aus. Das hat den Vorteil, dass auch repetitive Bereiche richtig sequenziert werden können, da es durch die langen *reads* einfacher ist, diese zu verbinden und durch die hohe Sequenziertiefe Fehler statistisch rausgerechnet werden können. Somit eignet sich die SMRT-Sequenzierung besonders gut um *Xanthomonas*-Genome mit mehreren TALEs zu sequenzieren.

Von den *Xoo*-Stämmen PXO35, PXO83, PXO142 und ICMP3125 wurde genomische DNA präpariert. Die Sequenzierung führten unsere Kooperationspartner von den New England Biolabs in den USA durch. Für den Stamm PXO83 war es möglich, mittels des „SMRT Analysis Servers“ und dem „RS_HGAP_Assembly“ ein Contig, also eine zusammenhängende DNA-Sequenz zu bekommen. Für die Stämme PXO142, ICMP3125 wurden jeweils zwei Contigs und für PXO35 vier Contigs erstellt. Durch Zusammenfassen der Contigs, aufgrund überlappender Sequenzen an den Contig-Enden, konnten für PXO142 und ICMP3125 jeweils ein Contig generiert werden. Dies ist für PXO35 nicht möglich. Nach dem *trimming* der Contig-Enden und der Zirkularisierung der Sequenzen, konnten die Finalen Genome analysiert werden. So entstanden das PXO83 Chromosom mit 5.025.428bp und einer 170fachen *coverage*, das PXO142 Chromosom mit 4.992.214bp und einer 376fachen *coverage* sowie das ICMP3125 Chromosom mit 4.990.660bp und einer 170fachen *coverage* (Tab. 3.3.2).

Stamm	Rasse	RFLP Typ	Jahr der Sammlung	Herkunft	Genomegröße	GC Gehalt	TALE Gene	PacBio coverage
PXO35	1	3	1972	Philippinen	4.975.663	63,70%		ca. 286x
PXO83	2	11	1976	Philippinen	5.025.428	63,70%	18	ca. 170x
PXO142	3	14	1981	Philippinen	4.992.214	63,70%	19	ca. 376x
ICMP3125				Indien	4.990.660	63,70%	17	ca. 170x

Tabelle. 3.3.2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Stämme, welche in dieser Arbeit verwendet wurden und genomische Parameter der PacBio-Sequenzierung.

3.3.3 Analyse von *Xanthomonas*-Genomen mit Hilfe von AnnoTALE

Da wir besonders an den *TALE*-Genen der *Xoo*-Stämme interessiert sind, sollten diese nun in den Genomen annotiert und verglichen werden. Dafür entwickelten wir zusammen mit unserem Kooperationspartner Dr. Jan Grau, „AnnoTALE“ (Grau *et al.*, 2016). AnnoTALE ist eine Software um 1) TALEs in *Xanthomonas*-Genomen zu identifizieren und analysieren, 2) TALEs, aufgrund ihrer RVD-Sequenz, in Klassen einzuteilen, 3) neue TALEs in bestehende Klassen einzuordnen, 4) TALEs eine vereinheitlichte Nomenklatur zu geben und 5) potentielle Ziele von einzelnen TALEs oder ganzen *TALE*-Klassen vorherzusagen (Grau *et al.*, 2016). Das Programm ist eine JavaFX-basierende

Desktopanwendung mit grafischer Benutzeroberfläche für interaktive Analysesessions. Die Applikation AnnoTALE sowie ein Nutzerhandbuch, mit Installationsanleitung und „Quick-Start-Guide“ sind verfügbar unter <http://www.jstacs.de/index.php/AnnoTALE>.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte von AnnoTALE am Beispiel der Genome von PXO83, PXO142 und ICMP3125 erläutert.

3.3.3.1 Identifizierung und Analyse von TALE-Genen

AnnoTALE identifiziert TALEs anhand von Sequenz-Homologien der einzelnen Domänen eines TALEs (N-Terminus, *repeat*-Region, C-Terminus). Mit Hilfe der Applikation „TALE Prediction“ von AnnoTALE können in den Genomen von PXO83, PXO142 und ICMP3125 TALEs gefunden werden. So findet AnnoTALE für PXO83 16 TALE-Gene und 2 putative Pseudogene, für PXO142 findet man 15 TALE-Gene und 4 Pseudogene und für ICMP3125 findet man 15 TALE-Gene und 2 Pseudogene (Tab. 3.3.2). Die Applikation „TALE Analysis“ zerlegt die einzelnen TALEs in ihre *repeat*-Region sowie N- und C-terminalen Bereiche. Dies erlaubt es, die RVD-Sequenzen der TALEs zu extrahieren und *repeats* mit abweichender Länge (abberante *repeats*) zu identifizieren. So kann man zum Beispiel im TALE Repertoire von PXO83 zwei TALEs mit abberantem langem *repeat* und zwei Pseudogene mit abberantem kurzem *repeat* identifizieren.

3.3.3.2 Erstellung von TALE-Klassen mit bekannten TALEs

Ein Ziel ist es, die TALEs, der von uns sequenzierten *Xoo*-Stämme, mit denen von bereits charakterisierten *Xanthomonas*-Stämmen und individuell sequenzierten TALEs vergleichen zu können. Dafür wurde zusammen mit unserem Kooperationspartner Dr. Jan Grau ein Paarweise-Vergleich der TALE Divergenz entwickelt, welcher die TALEs in Klassen einteilt. Die Grundidee dahinter ist es, TALEs anhand ihrer Bindespezifität zusammenzufassen, da dies auf eine ähnliche oder gleiche Funktion hinweist. Da die Bindespezifität von TALEs primär durch die *repeat*-Region und die RVD-Sequenz bestimmt wird, basiert die Klassifikation der TALEs auf einem Vergleich der RVD-Sequenzen. Grundsätzlich werden alle TALE RVD-Sequenzen untereinander verglichen. Bei dem Vergleich der RVD-Sequenz werden ungleiche Aminosäuren an Position 12 und 13 mit Punkten bestraft. Eine Fehlpaarung an Position 12 wird mit 0,2 Punkten und eine Fehlpaarung an Position 13 wird mit 0,8 Punkten bestraft. Diese Punktvergabe reflektiert die Wichtigkeit der Aminosäuren für die Bindespezifität, da nur die 13. AS den direkten Kontakt zur DNA ausübt. Wenn an beiden Positionen des RVD Fehlpaarungen sind, resultiert das in einer Punktvergabe von 1,0. Lücken innerhalb einer TALEs werden streng bestraft, da dies einen großen Einfluss auf die Spezifität hat. Dabei wird das Öffnen einer Lücke mit 5,0 und die Erweiterung mit 1.0 Punkten bestraft. Um TALEs mit

des „TALE Class Assignment“ Programms. Zu sehen sind zwei Beispiele für TALE-Klassen, Klasse AD und AP. RVD-Unterschiede sind schwarz markiert. Ein Strich zwischen zwei Aminosäuren eines RVD bedeutet, die Aminosäure stimmt überein. Punkte zwischen zwei Aminosäuren eines RVD bedeutet, die Aminosäure stimmt nicht überein.

3.3.3.3 Eine universelle Nomenklatur für TALEs

Die ersten TALEs die identifiziert wurden sind, wurden entweder nach der Resistenzreaktion die sie hervorrufen benannt (z.B. AvrXa7, AvrXa10, AvrBs3) oder nach ihrem Beitrag zur Pathogenität des Bakteriums (z.B. PthA, PthB). Dadurch, dass zum Beispiel ein und dieselbe Resistenzreaktion von zwei TALEs mit verschiedenen RVD-Sequenzen ausgelöst werden kann, ist diese Art der Nomenklatur nicht eindeutig.

TALEs, welche durch Genomsequenzierung identifiziert wurden, wurden bisher zumeist ausgehend vom ORI in TALE-Cluster eingeteilt, welche nummeriert wurden. Jeder einzelne TALE bekam danach die Nummer des Clusters, in dem er sich befindet, zusammen mit einem Buchstaben als Namen, zum Beispiel Tal2a (Salzberg *et al.*, 2008). Nun kann es, bei verschiedenen *Xanthomonas*-Stämmen, durch genomische Veränderungen dazu kommen, dass zwei TALEs mit der identischen oder nahezu identischen RVD-Sequenz unterschiedliche Namen tragen. Ein Beispiel dafür sind die TALEs Tal9e von PXO99 und Tal3 von MAFF311018. Es kann aber auch sein, dass zwei TALEs denselben Namen tragen aber eine komplett unterschiedliche RVD-Sequenz besitzen, wie zum Beispiel die TALEs Tal1a von PXO99 und Tal1a von MAFF311018. Wenn man nun die TALEs zwischen den beiden Stämmen vergleichen möchte, reicht es nicht sich die Namen der TALEs anzusehen. Man muss sich eine Übersicht der TALEs in beiden Stämmen erstellen und die RVD-Sequenzen manuell vergleichen um zu analysieren welche TALEs die beiden Stämme miteinander teilen und welche nur in einem Stamm vorkommen.

Um dies nun zu vereinfachen und einer großen Zahl an TALEs eindeutige Namen zu geben, wurde eine neue eindeutige Nomenklatur für TALEs entwickelt. Diese Nomenklatur basiert auf der Einteilung der TALEs in TALE-Klassen. Der Name setzt sich dabei folgendermaßen zusammen: 1) Der Name startet mit „Tal“ 2) gefolgt von einem zwei Buchstaben Code, welcher die Klasse bezeichnet (z.B. AA) und 3) der Nummer des TALEs in seiner Klasse. Dieser neue Name für einen TALE identifiziert ihn bereits eindeutig. AnnoTALE gibt aber zusätzlich eine Information über den *Xanthomonas*-Stamm aus welchem der TALE stammt.

Wendet man die neue Nomenklatur nun auf die TALEs an, so wird aus Tal9e aus PXO99 TalAD1 und aus Tal3 von MAFF311018 TalAD2. Unter Verwendung der neuen Nomenklatur wird sofort klar, dass diese beiden TALEs ähnlich sind. Das heißt sie besitzen identische oder fast identische RVD-Sequenzen. In diesem Fall haben die beiden

TALEs identische RVD-Sequenzen, können dasselbe Ziel binden und somit kann man einfach feststellen, dass PXO99 und MAFF311018 den gleichen TALE besitzen.

3.3.3.4 Klassifikation der TALEs von PXO83, PXO142 und ICMP3125

Die Zuordnung neuer TALEs zu den bestehenden Klassen basiert auf demselben Prinzip wie die Klassifikation der bekannten TALEs. Als erstes wird der *average divergence score* zwischen den neuen TALEs und den bestehenden Klassen ermittelt. Überschreitet der *average divergence score* den *threshold* ($T=5.0$) der dem TALE ähnlichsten Klasse nicht, so wird der TALE dieser Klasse zugeordnet. Anderenfalls wird der TALE das erste Mitglied in einer neuen TALE-Klasse. Diese Klassifikation neuer TALEs ist in der Applikation „TALE Class Assignment“ von AnnoTALE enthalten.

Nach der Klassifikation der TALEs der *Xoo*-Stämme PXO83, PXO142 und ICMP3125 kann festgestellt werden, dass insgesamt vier neue TALEs identifiziert wurden (Tab. 3.3.4). Diese sind der TALE TalCA1 in PXO83, TalDQ1 (Pseudogen) in PXO142 und TalDO1 und TalDP1 in ICMP3125. Alle anderen TALEs dieser drei Stämme konnten bereits existierenden TALE-Klassen zugeordnet werden. Beispielhaft sind zwei TALE-Klassen in der Abbildung 3.3.3.2 dargestellt. Betrachtet man die TALE-Klassen genauer, kann festgestellt werden, dass sich in den aller meisten Fällen entweder TALEs aus *Xoo*- oder *Xoc*-Stämmen in den einzelnen TALE-Klassen befinden. Es gibt nur wenige TALE-Klassen bei denen TALEs von Vertretern beider Pathovaren zu finden sind. Ein solches Beispiel, bei dem sich *Xoo* und *Xoc* TALEs mit großer Ähnlichkeit teilen, ist die TALE-Klasse AD (Abb. 3.3.3.2B). Die Klasse AD besteht zurzeit aus 14 Mitgliedern und alle Mitglieder haben 23,5 *repeats* (Abb. 3.3.3.2). In dieser Klasse gibt es sozusagen zwei Unterklassen. Die erste Gruppe von TALEs in der Klasse AD hat an Position 7 den RVD N* und an Position 10 den RVD NS. Zu dieser Gruppe gehören 7 TALEs, wobei 6 aus *Xoo* und einer aus *Xoc* stammt. Die zweite Gruppe hat an Position 7 die RVD HD und an Position 10 die RVD NN. Zu dieser Gruppe gehören 6 TALEs, welche alle aus *Xoc*-Stämmen stammen. Der TALE TalAD13 aus dem Stamm ICMP3125 bildet eine Brücke zwischen diesen beiden Gruppen. Er besitzt an Position 7 die RVD N* und an Position 10 die RVD NN. Alles in allem ist diese TALE-Klasse aber sehr ähnlich untereinander. Dies legt nahe, dass diese TALEs alle dasselbe pflanzliche Gen induzieren. Im zweiten Beispiel in Abbildung 3.3.3.2 ist die Klasse AP dargestellt. Diese Klasse hat 6 Mitglieder, wobei die TALEs von den Stämmen PXO99, PXO83, PXO86, PXO142 und ICMP3125 identische RVD-Sequenzen aufweisen. Der TALE aus dem Stamm MAFF311018, TalAP2 hingegen weist Aminosäureaustausche in den RVDs an Position 6,8,9,14 und 19 auf. Diese Unterschiede im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der Klasse resultiert in einem *average divergence score* von 4,0, welcher nahe dem *threshold* von 5,0 liegt. Dieses

Beispiel zeigt die Fähigkeit der Klassifizierung, Ähnlichkeiten zwischen TALEs aufzudecken, welche nicht sofort offensichtlich sind.

3.3.3.5 Vorhersage potentieller Ziele der TALE-Klassen oder einzelner TALEs mit AnnoTALE

Nach der Klassifikation der TALEs ist die Funktion der TALEs als Virulenzfaktoren von besonderem Interesse. Um eine erste Analyse durchzuführen, wurde in der Applikation „Predict and Intersect Targets“ von AnnoTALE eine Zielgen-Vorhersage eingebettet. Diese funktioniert ähnlich wie TALgetter. Im Vergleich zu TALgetter sind die Vorhersage- und Einstellmöglichkeiten jedoch begrenzt. So kann die Applikation „Predict and Intersect Targets“ nur die Top 100 Ziele anzeigen und es ist nicht möglich p-Werte berechnen zu lassen. Somit empfiehlt es sich für genauere Analysen zu potentieller Ziele TALgetter zu verwenden. Mit AnnoTALE ist es möglich, für einzelne TALEs, ganze TALE-Klassen oder für alle TALEs in allen Klassen potentielle Ziele vorherzusagen.

Auf diese Weise wurden für die *Xoo*-Stämme PXO83, PXO142 und ICMP3125 eine erste Zielgen-Vorhersage gemacht.

3.3.3.6 Einteilung der TALEs in genomische TALE-Cluster

Analysiert man die Verteilung von TALEs in einem Genom eines *Xoo*-Stammes, so ist zu erkennen, dass diese nicht zufällig im Genom verteilt sind. Gene für TALEs sind zumeist an mehr oder weniger konservierten Loci zu finden, sogenannte TALE-Cluster. Diese Cluster sind bisher fortlaufend nummeriert wurden. In unterschiedlichen Genomen jedoch nach unterschiedlichen Nummerierungsschemata, sodass gleiche TALE-Cluster in verschiedenen Genomen unterschiedliche Namen besitzen. Um phylogenetische Untersuchungen zu vereinfachen, ist es sinnvoll die Nomenklatur der TALE Loci zu erneuern.

Um die TALE-Cluster auf eine andere Art und Weise zu benennen, wurden die drei zuerst sequenzierten *Xoo*-Stämme MAFF311018, KACC10331 und PXO99 herangezogen. Dabei werden die Loci Anhand der flankierenden Gene bestimmt. Den gleichen Namen in verschiedenen Genomen bekommt ein TALE Locus, wenn mindestens eines der flankierenden Gene konserviert ist, mobile Elemente ausgenommen. Der Name setzt sich aus einem „T“ und einer römischen Zahl zusammen (z.B. T-II). Die flankierenden Gene zur Definition der TALE-Cluster sind in Tabelle 3.3.3.6 zusammengestellt. Vergleicht man nun verschiedene Genome untereinander, kann man zum Beispiel erkennen, dass die *tal* Pseudogene in den Clustern T-III und T-VII zusammen in der TALE-Klasse AI sind (Abb. 3.3.3.5).

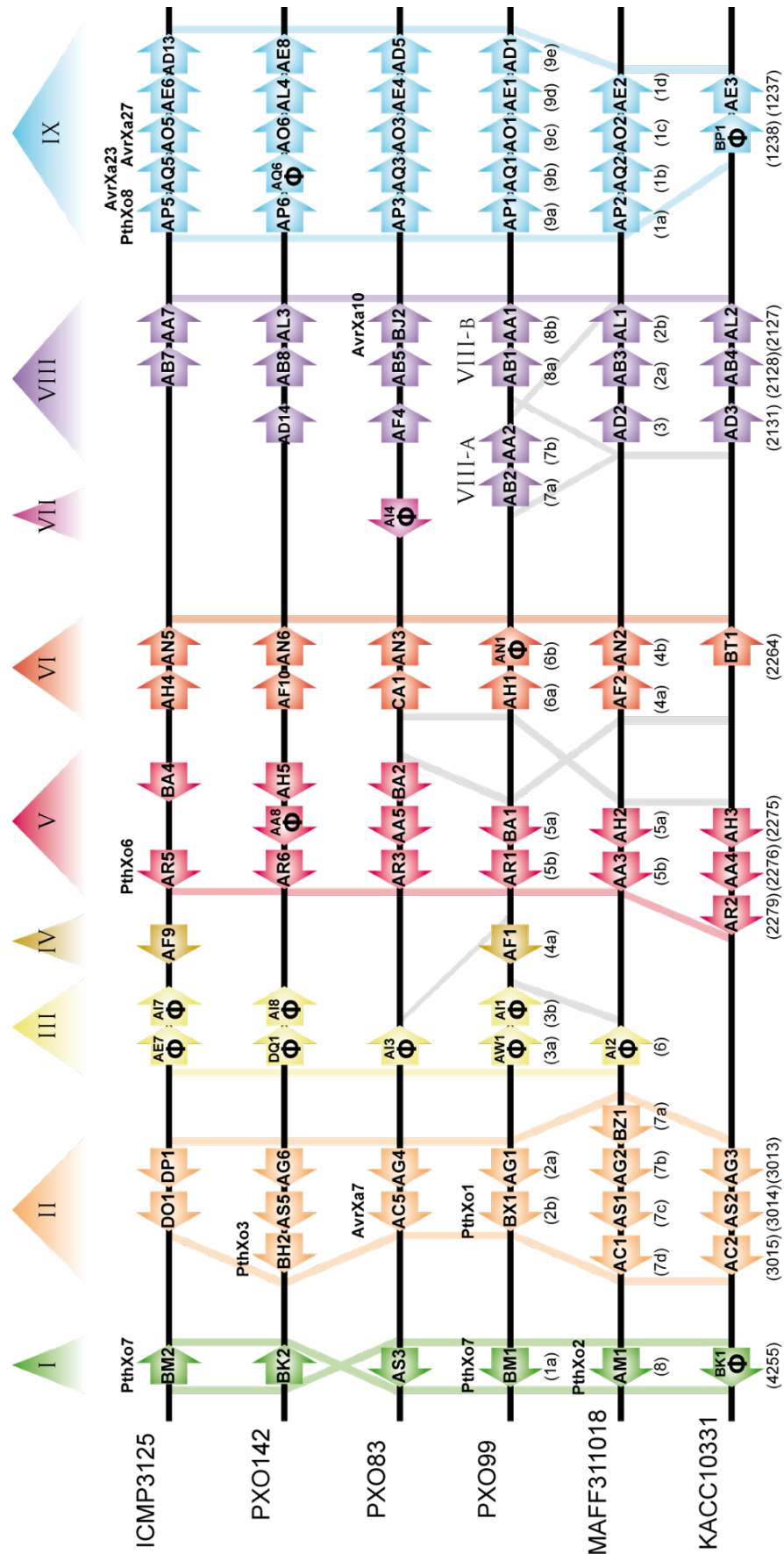


Abbildung 3.3.3.5 Verteilung der TALE-Gene in *Xoo*-Stämmen ICMP3125, PXO142, PXO83, PXO99, MAFF311018 und KACC10331. Die einzelnen TALE-Gene sind als Pfeile dargestellt, welche die Orientierung

der Gene im Genom anzeigen. Dabei ist der Start des Pfeils das 5'- und die Pfeilspitze das 3'-Ende. Die TALEs sind innerhalb der Pfeile mit ihren neuen Namen beschriftet. Unter den Pfeilen stehen die bisherigen Namen oder Gennummern in Klammern. In fett geschriebene Namen über den Pfeilen sind TALEs mit Pth- oder Avr-Namen. Pseudogene sind mit dem griechischen Buchstaben phi (ϕ) gekennzeichnet. Die neu zugeordneten TALE-Cluster (T-I bis T-IX) sind mit römischen Zahlen, über dem Schema, gekennzeichnet. Die verschiedenen Farben zeigen die Zugehörigkeit zu einem TALE-Cluster an. Die farbigen Streben repräsentieren die genomische Region, anhand welcher die Definition der TALE-Cluster erfolgte. Das TALE-Cluster T-VII ist nur in dem Genom von PXO83 zu finden. Die grauen Streben repräsentieren ausgesuchte genomische Regionen, welche nicht zur Definition der TALE-Cluster genutzt wurden.

Dies zeigt, dass diese Gene einen gemeinsamen Ursprung haben und durch genomische Neuarrangements nun an unterschiedlichen Orten in *Xoo*-Genomen liegen. Weiterhin kann man bei dem Vergleich der Cluster in verschiedenen Genomen erkennen, dass manche TALE-Cluster verschiedene TALEs an derselben Stelle im Genom beinhalten (z.B. Cluster T-I TalBM1/PthXo7 in PXO99, TalAS3 in PXO83 und TalAM1/PthXo2 in MAFF311018; Abb. 3.3.3.5). Auf der anderen Seite ist die Reihenfolge von TALE-Genen in anderen Clustern sehr ähnlich, nur die Anzahl an TALE-Genen variiert aufgrund von Deletionen oder Insertionen (z.B. Cluster T-IX; Abb. 3.3.3.5).

3.3.4 Vergleich der TALE-Repertoires verschiedener *Xoo*-Stämme

Mit der Einteilung der TALEs in TALE-Klassen ist ein Vergleich der TALE-Repertoires verschiedener *Xoo*-Stämme relativ einfach durchführbar. In dieser Arbeit werden 15 sequenzierte *Xoo*-Stämme verglichen. Diese sind die drei sequenzierten Stämme KACC10331, MAFF311018 und PXO99. Hinzu kommen die drei in dieser Arbeit sequenzierten Stämme PXO83, PXO142 und ICMP3125 sowie PXO71, PXO86, PXO145, PXO211, PXO524, PXO563, PXO282, PXO236 und PXO602, welche während der Erstellung dieser Arbeit von Quibod *et al.* mittels SMRT-Sequenzierung sequenziert wurden (Quibod *et al.*, 2016).

Sieht man sich alle TALEs bzw. TALE-Klassen an, welche in den 15 Stämmen vorkommen, so findet man 36 verschiedene TALE-Klassen. Jeder der einzelnen Stämme besitzt zwischen 13-19 TALEs. Somit wird klar, dass verschiedene *Xoo*-Stämme TALEs aus derselben TALE-Klasse besitzen. In Tabelle 3.3.4 findet sich eine Übersicht der 36 TALE-Klassen und welche davon in welchem Stamm vertreten ist. Anhand dieser Übersicht kann man die TALEs aus den 15 verschiedenen Stämmen in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe besteht aus 12 TALE-Klassen. Diese sind in mindestens 13 der 15 *Xoo*-Stämme zu finden. Darunter befinden sich z.B. die TALEs des Clusters IX TalAP, AQ, AO, AE und AD sowie TalAR. Dabei kann festgestellt werden, dass die TALEs TalAB und TalAD die einzigen zwei TALEs sind, welche in jedem der untersuchten Stämme zu finden sind. Die zweite Gruppe besteht aus 18 TALE-Klassen. Diese sind nur in einem bis maximal vier Stämmen zu finden.

TALE Cluster	Flankierende Gene 5'^a	Flankierende Gene 3'^b
T-I	lipase family CDS (protein ID: ACD57201.1)	orfB CDS (protein ID: ACD57196.1)
T-II	tetratricopeptide repeat domain protein CDS (protein ID: ACD58247.1)	RND superfamily protein CDS (protein ID: ACD58240.1)
T-III	TonB-dependent receptor CDS (protein ID: ACD58443.1)	- ^c
T-IV	- ^d	- ^d
T-V	- ^e	glyoxalase family protein CDS (protein ID: ACD58912.1)
T-VI	- ^e	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase domain protein CDS (protein ID: ACD58954.1)
T-VII	- ^d	- ^d
T-VIII	- ^f	serS CDS (protein ID: ACD59234.1)
T-IX	Uroporphyrinogen decarboxylase HemE (protein ID: ACD60555.1)	TonB-dependent outer membrane Receptor (protein ID: ACD60577.1)

Tabelle 3.3.3.6 Definition der TALE-Cluster. ^a das nächste Gen, welches kein mobiles Element oder Transposon ist, 5' von dem ATG des *TALE*-Gens. ^b das nächste Gen, welches kein mobiles Element oder Transposon ist, 3' von dem Stop-Codon des *TALE*-Gens. ^c Auf der 3'-Seite des Clusters wird dieses, in verschiedenen *Xoo*-Stämmen, nicht von dem selben Gen flankiert. ^d Aufgrund von Rekombinationen zwischen genomischen Regionen ist es nicht möglich, dieses Cluster anhand von flankierenden Genen zu definieren. ^e Aufgrund von Inversionen zwischen PXO-Stämmen und den Stämmen MAFF311018 und KACC10331 können die Gene auf der 5'-Seite des Clusters variieren. ^f Auf der 5'-Seite des Clusters wird dieses, in verschiedenen *Xoo*-Stämmen, nicht von dem selben Gen flankiert.

Darunter finden sich z.B. TalBH, TalBX oder TalBM. Dabei kann festgestellt werden, dass in dieser Gruppe mit TalBH und TalBX zwei von vier TALEs, welche ein *OsSWEET*-Gen induzieren, sind. Die dritte Gruppe besteht aus 6 TALEs, welche in 5 bis 12 Stämmen zu finden sind. Diese TALEs sind TalAH, TalAL, TalAS, TalBA und die beiden anderen *OsSWEET*-Gen induzierende TALEs TalAM und TalAC. Somit sind diese beiden *OsSWEET*-Gen induzierende TALEs in den 15 untersuchten Stämmen die am häufigsten auftretenden. Jeder der TALEs TalAM und TalAC kommt in 7 Stämmen vor. Die meisten *Xoo*-Stämme besitzen nur einen TALE der ein *OsSWEET*-Gen induziert und als „*major virulence factor*“ (Schlüssel-Virulenzfaktor) bezeichnet werden kann. Ausnahmen bilden die Stämme MAFF311018, PXO524 und PXO236, welche TalAM besitzen, welcher *OsSWEET12* induziert und TalAC, welcher *OsSWEET14* induziert. Eine weitere Ausnahme bildet der Stamm PXO71, welcher TalAM besitzt, der *OsSWEET12* induziert

und TalBX, der *OsSWEET13* induziert. Die *OsSWEET*-Gen induzierende TALEs TalBH und TalBX kommen nur ein- beziehungsweise zweimal in den 15 Stämmen vor. Die ersten zwei TALE-Gruppen bilden mehr als 70% der TALE-Repertoires der Stämme ab. Somit kann festgestellt werden, dass diese 15 *Xoo*-Stämme sozusagen ein Grund-Set an TALEs (Gruppe 1) besitzen, welches durch mehr oder weniger stammspezifische TALEs (Gruppe 2 und 3) ergänzt wird. Von den 12 TALE-Klassen der ersten TALE-Gruppe (Grund-Set) sind von lediglich 2 TALEs, TalAR und TalAP, pflanzliche Ziele bekannt. Dabei induziert TalAR die Transkription des Transkriptionsfaktors *OsTFX1* und TalAP die Transkription der Methyltransferase *OsHEN1*. Es ist jedoch nicht bekannt welche sekundären Effekte die Induktion von *OsTFX1* und *OsHEN1* hat und welche Bedeutung die Induktion dieser beiden Gene für die Virulenz von *Xoo* hat. Vielleicht ist auch die Kombination verschiedener TALEs aus dieser Gruppe für die Virulenz von *Xoo* wichtig.

Nun stellt sich die Frage, welche Ziele haben die TALEs der Gruppe 1 und spielen sie eine besondere Rolle in der Virulenz von *Xoo*? Des Weiteren sind auch von den TALEs der stammspezifischen Gruppen 2 und 3 nur von wenigen pflanzliche Ziele bekannt. So bleibt auch für die Mehrzahl dieser TALEs offen, welche Rolle sie im Infektions- und Verbreitungsprozess von *Xoo* spielen.

3.3.5 Suche nach TALE-Zielen in Reis mittels RNAseq-Analyse

Nach der Sequenzierung der vier *Xoo*-Stämme und Analyse der TALE Repertoires, sollten nun neue Zielgene für TALEs identifiziert werden. Für die Identifizierung neuer Zielgene von TALEs in Reis werden Expressionsdaten von infiziertem und nicht-infiziertem Reis benötigt. Somit kann die Genregulation zwischen beiden Stadien, infiziert und nicht infiziert, verglichen werden. Auf diese Weise können im ersten Schritt differentiell exprimierte Gene ermittelt werden. Diese werden dann im zweiten Schritt auf das Vorhandensein von TALE-Bindestellen der entsprechenden *Xoo*-TALEs untersucht.

In dieser Arbeit wurde dafür eine RNAseq Analyse mit dem Reiskultivar *Nipponbare* und den sequenzierten *Xoo*-Stämmen PXO83, PXO142, PXO35 und ICMP3125 sowie einer $MgCl_2$ -Kontrolle (mock) durchgeführt. Dafür wurden pro Stamm und Kontrolle 18 Blätter von *Nipponbare* Pflanzen inokuliert (Abb. 3.3.5.1). Es wurden drei Replikate an unterschiedlichen Tagen hergestellt. Für jedes Replikat wurden pro Probe (*Xoo*-Stamm oder mock) zwei Blätter von drei Reispflanzen inokuliert. Zum einen sollte so gewährleistet werden, dass es zu einer korrekten Abbildung der biologischen Varianz kommt und zum anderen, dass eine ausreichende Menge an RNA, für die anschließende RNAseq-Analyse, isoliert werden kann.

Xoo-Stamm	KACC10331	MAFF311018	PX099	PX086	PX083	PX0142	ICMP3125	PX0145	PX0211	PX071	PX0524	PX0563	PX0282	PX0236	PX0602	TALE in mindestens 13 Stämmen vorhanden	TALE in 4 oder weniger Stämmen vorhanden	TALE in 5 bis 12 Stämmen vorhanden
AA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AB	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AD	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AG	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AH	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AI	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AL	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AM	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AN	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AO	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AP	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AQ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AR	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AS	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AW	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
BA			X	X	X		X	X	X					X	X			
BJ				X	X			X						X	X			
BK	X					X												
BH						X												
BM	X		X				X											
BT	X																	
BP	X																	
BX																		
BZ		X								X								
CA																		
DQ				X	X			X	X	X	X							
DR												X						
DS									X									
DT									X									
DU									X									
DV												X						
DW							X								X			
DX							X								X			
36	13/36 (13)	17/36 (17)	17/36 (19)	17/36 (18)	17/36 (18)	18/36 (19)	16/36 (17)	16/36 (18)	17/36 (17)	18/36 (19)	17/36 (17)	18/36 (18)	15/36 (15)	16/36 (16)	17/36 (20)	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3

Tabelle 3.3.4 Vergleich der TALE-Repertoires von 15 verschiedenen Xoo-Stämmen.

Um sicherzustellen, dass so wenig wie möglich sekundäre Effekte gemessen werden, wurden die Proben bereits nach 24 Stunden geerntet und die RNA isoliert. Zur Kontrolle der Infektionen der Reispflanzen mit den einzelnen Stämmen, wurden die RNA Proben einzeln mit Hilfe einer qRT-PCR getestet (Abb. 3.3.5.1D).

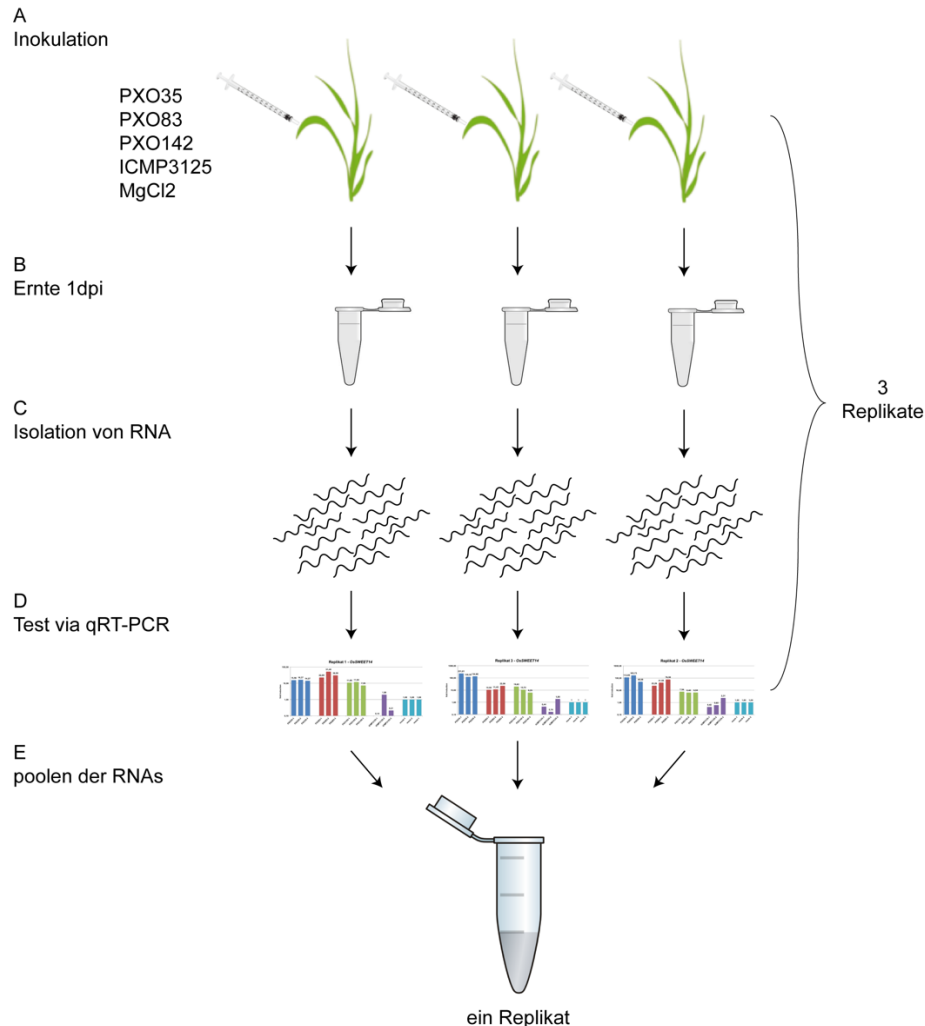


Abbildung 3.3.5.1 Schema der Probenbehandlung des RNAseq-Experiments. A) Infektion von Reispflanzen mit *Xoo*-Stämmen. Für ein Replikat wurden die *Xoo*-Stämme PXO35, PXO83, PXO142 und ICMP3125 mit einer $OD_{600} = 0,5$ sowie $MgCl_2$, in je zwei Blätter von drei Pflanzen der suszeptiblen Reislinie *Nipponbare* (*Oryza sativa* ssp *japonica*) inokuliert. Insgesamt wurden drei Replikate hergestellt. B) 24 Stunden nach der Inokulation wurden die Blattbereiche geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. C) Die total RNA wurde isoliert. D) Die isolierte RNA wurde mittels qRT-PCR-Analyse getestet. E) Danach wurden die drei RNA-Proben zu einem Replikat vereinigt.

Dafür wurden zwei bereits bekannte Zielgene von *Xoo* TALEs ausgewählt. Das erste Zielgen, welches auf Expression getestet wurde, war *OsHen1* (*Os07g06970*). *OsHen1* wird durch den TALE TalAP induziert. Diesen TALE besitzen alle vier getesteten *Xoo*-Stämme. Daher sollte nach erfolgreicher Infektion von Reis mit den einzelnen Stämmen in jedem Fall eine Induktion des Gens festzustellen sein. Das zweite Gen, welches auf Expression getestet wurde, war *OsSWEET14* (*Os11g31190*). *OsSWEET14* wird durch den TalAC und TalBH induziert. Die Stämme PXO83, PXO35 und PXO142 besitzen je

einen dieser beiden TALEs. Der Stamm ICMP3125 besitzt keinen dieser TALEs. Somit sollte nach erfolgreicher Infektion mit den einzelnen Stämmen bei den drei ersten genannten Stämmen eine Induktion des Gens nachweisbar sein. Bei der durchgeführten qRT-PCR-Analyse wurden alle Proben, die später zu einem Replikat zusammengefasst werden, einzeln betrachtet. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb.3.3.5.2 dargestellt. Bei der Analyse der Expression von *OsHen1* ist generell für alle Stämme eine Induktion der Genexpression nachweisbar. Die Induktion des Gens durch den Stamm ICMP3125 ist jedoch sehr gering (Abb. 3.3.5.2D-F). Außerdem schwanken die Induktionsraten zum Teil stark zwischen den einzelnen Proben von verschiedenen Pflanzen eines Replikats. So schwanken die Induktionsraten bei PXO83 bei den Proben für Replikat 3 von 0,89 bis 1,51, um fast das Doppelte. Bei der Analyse der Expression des Gens *OsSWEET14* kann ebenfalls generell eine Expression des Gens bei allen drei Stämmen, welche einen entsprechenden TALE besitzen, nachgewiesen werden. Auch hier sind die Schwankungen zwischen den Proben eines Replikats relativ groß. So schwanken die Induktionsraten von PXO83 bei Replikat 2 zum Beispiel von 23,29 bis 76,50 (Abb. 3.3.5.2 A-C). Da die Infektion mit den einzelnen Stämmen generell erfolgreich war und für die beiden getesteten Gene jeweils eine Induktion nachweisbar war, wurde die isolierte RNA der drei Pflanzen zu einem Replikat zusammengefasst (Abb. 3.3.5.1). Die isolierte RNA wurde dann an die Firma *euofins Genomics* geschickt, welche die Erstellung der cDNA-Bibliotheken und die Sequenzierung durchführte.

3.3.5.1 Analyse der RNAseq-Daten

Die bioinformatische Auswertung der Daten wurde von unserem Kooperationspartner Dr. Jan Grau durchgeführt. Als erstes wurden die erhaltenen Sequenz-*reads* auf das Reisgenom kartiert und die *reads* pro Gen ermittelt. Diese *reads* pro Gen werden als *counts* bezeichnet. Anhand der *counts* kann nun eine Normalisierung erfolgen und differenziell exprimierte Gene können identifiziert werden. Dafür wurden mit Hilfe von DESeq2 drei verschiedene „*log2 fold changes*“ (lfc) ermittelt. Der erste ist der „normale“ lfc. In die Berechnung fließen sowohl die Mittelwerte der *counts* der Replikate sowie die Schwankungen über die Replikate ein. Der zweite ist der lfc.MLE. Dieser wird wie der „normale“ lfc berechnet, jedoch lässt man hierbei die Schwankungen der Replikate außer Acht. Der dritte und letzte ist der lfc.med. Hierbei wird bei der Berechnung nicht der Mittelwert, sondern der Median der Replikate verwendet. Dadurch ist der lfc.med unempfindlicher gegenüber großen Schwankungen zwischen den Replikaten.

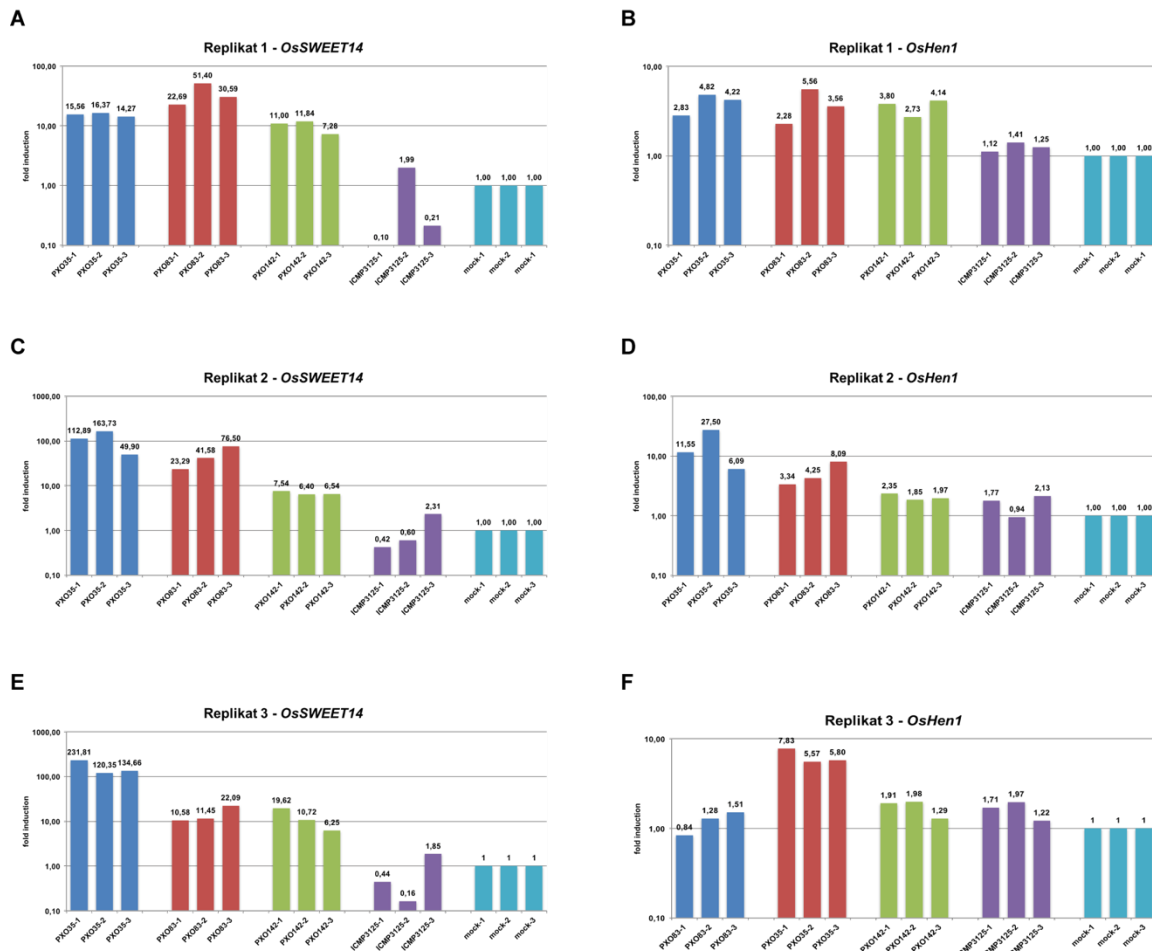


Abbildung 3.3.5.2 qRT-PCR-Analyse zum Test der einzelnen Proben für ein Replikat. Die totale RNA aus zwei Blattabschnitten pro Pflanze wurde mit Hilfe des „Qiagen RNeasy“ Kits isoliert. Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des „Maxima First Strand cDNA Synthesis“ Kit von Thermo Fisher in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR-Analyse getestet. Es wurden die Gene *OsSWEET14* und *OsHen1* auf Induktion der Expression analysiert. **A, C, und E**) qRT-PCR-Analyse zum Test der Induktion der Expression des Gens *OsSWEET14*. **B, D und F**) qRT-PCR-Analyse zum Test der Induktion der Expression des Gens *OsHen1*. Nach der qRT-Analyse wurden die drei RNA-Proben zu einem Replikat vereinigt und für die RNAseq-Analyse verwendet. Die RNAseq-Analyse wurde durch die Firma *euofins Genomics* durchgeführt. blau – PXO35, rot – PXO83, grün – PXO142, lila – ICMP3125, türkis – MgCl₂. Über den Balken der Diagramme sind die Induktionswerte dargestellt.

Nach der Ermittlung der differentiell exprimierten Gene, wurde mit Hilfe von TALgetter überprüft, ob in den Promotorbereichen der induzierten Gene TALE-Bindestellen, für die TALEs des *Xoo*-Stämme, vorhergesagt werden können. Diese Informationen wurden nun kombiniert, sodass man eine Liste erhält in dem zum einen die differentiell exprimierten Gene zu finden sind, als auch Informationen darüber, welcher TALE eine vorhergesagte Bindestelle im Promotorbereich der Gene hat sowie auf welchem Rang der TALgetter Vorhersage sich diese Bindestelle befindet. So wurde für jeden *Xoo*-Stamm PXO83, PXO142, ICMP3125 und PXO35 eine solche Liste erstellt.

3.3.5.2 Erstellung einer Kandidatenliste durch Vergabe eines Zielgen-scores

Als nächstes mussten mit Hilfe dieser Listen potentiell interessante und vielversprechende Zielgene identifiziert werden. Dafür wurde zunächst der konservative (normale) lfc betrachtet. Alle Gene mit einem lfc > 0,3 wurden zunächst in eine neue Liste kopiert und nach TALE-Klasse geordnet. Um die vielversprechendsten Ziele herauszufiltern, wurde dann für alle potentiellen Zielgene einer TALE-Klasse ein Zielgen-score vergeben. In diesen score fließen 5 Kriterien ein. Wenn ein Kriterium erfüllt ist, gibt es 1-3 Punkte dafür. Es gibt 1 Punkt, wenn der lfc > 0,6 ist; 1 Punkt, wenn der lfc.med > 2,5 ist und 2 Punkte, wenn das Gen für mehr als einen Stamm gefunden wird. Das heißt, kommt der TALE in mehr als einem Stamm vor und das potentielle Zielgen wird für mindestens 2 dieser Stämme gefunden, gibt es 2 Punkte für den score. Weiterhin gibt es 1 Punkt, wenn der Rang der Vorhersage unter den Top 50 liegt und 3 Punkte, wenn der Rang der Vorhersage unter den Top 20 liegt. Somit können maximal 6 (wenn der TALE nur in einem Stamm vorkommt) oder 8 Punkte erreicht werden. In Tabelle 3.3.5.2 sind alle potentiellen Zielgene, von 20 TALE-Klassen, mit einem score > 4 zusammengefasst. Grundsätzlich wurde entschieden, dass alle Gene mit einem score von 4 und höher interessant sind und es sich lohnt diese näher zu untersuchen. Gene mit einem score von 5-8 sind sehr interessant und haben eine hohe Wahrscheinlichkeit Zielgene für die entsprechenden TALEs zu sein.

Für fünf TALE-Klassen der getesteten *Xanthomonas*-Stämme sind Zielgene bekannt. Als Kontrolle, wie gut der vergebene score ist, wurden zunächst diese TALEs betrachtet (Tab. 3.3.5.2.). So ist festzustellen, dass für die Klasse TalAR das Zielgen *TFX1* (bzsp Transkriptionsfaktor, *Os09g29820*) und für die Klasse TalAP das Zielgen *Hen1* (*Os07g06970*) einen score von 7-8 aufweisen. Die Zielgene *TFIIAγ* (*Os01g73890*) für Klasse TalBM und *SWEET14* (*Os11g31190*) für die Klasse BH erzielen einen score von 5. Somit scheint der vergebene score eine mögliche Informationsquelle um potentielle Zielgene von TALEs zu identifizieren.

3.3.5.3 Identifizierung und Test von potentiellen Zielgenen

Mit Hilfe des vergebenen Zielgen-scores konnten nun vielversprechende Kandidaten für TALE-Ziele ermittelt werden. Betrachtet man die Liste mit potentiellen Zielgenen in Tabelle 3.3.5.2, so kann man für neun TALE-Klassen, für die noch keine Zielgene bekannt sind, vielversprechende Kandidaten identifizieren. So findet man zum Beispiel für den TalAQ ein Flavonol-Synthase-Gen (*Os03g03034*), für den TalAO ein Gen mit bisher unbekannter Funktion (*Os02g40410*) sowie ein Phosphat-Transporter-Gen (*Os06g29790*) und für den TalAB ein Pektat-Lyase-Gen (*Os08g07760*) und ein BAK1-Gen (*Os08g07760*; Tab. 3.3.5.3).

TALS	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0505g50310	Ox04g19960.1: ZF-HD protein dimerisation region containing protein, expressed	TalAS6.PX035	12	0.954173608	0.62860206	0.53876118	0	0	0	1	1	3	4
TalBM (PthX67)	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0501g273890	Ox04g19960.1: retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed	TalBWM2.ICMP3125	2	1.39498638	1.61305196	1.54490066	1	0	0	1	1	3	5
TalAC (AvrXa7)	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0504g19960	Ox04g19960.1: retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed	TalAC5.Xoo.PX083	14	0.307208264	1.719174728	3.27397583	0	1	2	1	1	3	7
LOC_0504g19960	Ox04g19960.1: retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed	TalAC7.PX035; TalA14.44	14	0.623237835	2.754483589	3.58571288	1	1	2	1	1	3	8
TalAG	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0504g02380	Ox04g02380.1: retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass, expressed	TalAG7.PX035	9	0.627513709	9.644981972	6.98481127	1	0	0	1	1	3	6
LOC_0501g47990	Ox01g47990.1: xylan-cytosine proteinase-2 precursor, putative, expressed	TalAG7.PX035	11	0.384927255	1.246232518	1.12064661	0	0	0	1	1	3	4
LOC_0503g64310	Ox03g64310.1: AGC_PVPK, like, like829, 18 - AGC kinases include homologue to PKA, PKG and PKI [TAAG67.PX035]	TalAG7.PX035; TalA14.48; 63	7	0.448872645	2.490446213	2.40985874	1	0	2	1	1	3	4
LOC_0511g01140.2	Ox11g01140.2: AGC_PVPK, like, like829, 18 - AGC kinases include homologue to PKA, PKG and PKI [TAAG67.PX035]	TalAG7.PX035	3	0.45368038	0.865945512	0.72388711	0	0	0	1	1	3	4
LOC_0511g01140.1	Ox11g01140.1: AGC_PVPK, like, like829, 18 - AGC kinases include homologue to PKA, PKG and PKI [TAAG67.PX035]	TalAG7.PX035	2	0.45368038	0.865945512	0.72388711	0	0	0	1	1	3	4
LOC_0511g01140	Ox11g01140.3: AGC_PVPK, like, like829, 18 - AGC kinases include homologue to PKA, PKG and PKI [TAAG67.PX035]	TalAG7.PX035	2	0.45368038	0.865945512	0.72388711	0	0	0	1	1	3	4
TalBH (PthX63)	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0502g49350	Ox02g49350.1: plastocyanin-like domain containing protein, putative, expressed	TalBH2.VK0142	17	2.27113567	7.816383659	7.07956717	1	1	0	1	1	3	6
LOC_0503g01530	Ox03g01530.1: pumilio-family RNA-binding repeat domain containing protein, expressed	TalBH2.VK0142	5	0.337373993	3.073986611	3.82168517	0	1	0	1	1	3	5
LOC_0511g1150	Ox11g1150.1: nudix family protein, putative, expressed	TalBH2.VK0142	1	0.360348956	4.75465571	3.94416623	0	1	0	1	1	3	5
LOC_0502g57120	Ox02g57120.1: HEN1 repeat family protein, putative, expressed	TalBH2.VK0142	2	0.394146108	0.66753777	0.27250333	0	0	0	1	1	3	4
TalAA	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0501g40290	Ox01g40290.1: expressed protein	TalAA7.ICMP3125	1	0.662288019	2.860178556	2.71726433	1	1	0	1	1	3	6
LOC_0511g27980	Ox11g27980.1: plant-specific domain TIGR01627 family protein, expressed	TalAA9.PX035	19	0.335911434	0.876114526	1.19504448	0	0	0	1	1	3	4
LOC_0502g43500	Ox02g43500.1: OK, putative, expressed	TalAA9.PX035	6	0.305572009	0.43715302	0.48663833	0	0	0	1	1	3	4
TalAR (PthX66)	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0509g23820	Ox09g23820.1: bZIP transcription factor domain containing protein, expressed	TalAR3.Xoo.PX083	1	0.910613236	4.789431316	4.47472135	1	1	2	1	1	3	8
LOC_0509g23820	Ox09g23820.1: bZIP transcription factor domain containing protein, expressed	TalAR7.PX035	1	1.360612989	6.871081912	6.73006894	1	1	2	1	1	3	8
LOC_0509g23820	Ox09g23820.1: bZIP transcription factor domain containing protein, expressed	TalAR5.ICMP3125	2	0.879487683	4.70862014	4.15369816	0	1	2	1	1	3	8
LOC_0509g23820	Ox09g23820.1: bZIP transcription factor domain containing protein, expressed	TalAR6.VK0142	1	0.87232174	3.898970107	4.18343293	0	1	2	1	1	3	7
LOC_0504g48000	Ox04g48000.1: peroxidase precursor, putative, expressed	TalAR5.ICMP3125	10	0.614685018	8.28850951	3.42811099	1	1	0	1	1	3	6
LOC_0510g28240	Ox10g28240.1: calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type, putative, expressed	TalAR5.ICMP3125	12	0.775288785	1.312904951	1.30611663	1	0	0	1	1	3	5
LOC_0501g68870	Ox01g68870.2: leucine-rich repeat receptor protein kinase EBS precursor, putative, expressed	TalAR7.PX035	20	0.3370398	0.433576506	0.416168833	0	0	0	1	1	3	4
TalBA	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0502g06670	Ox02g06670.1: retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed	TalBA4.ICMP3125	1	1.064363882	9.835835516	4.49721533	1	1	2	1	1	3	8
LOC_0502g06670	Ox02g06670.1: retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed	TalBA2.Xoo.PX083	1	0.341277644	7.51799109	2.65008833	0	1	2	1	1	3	7
LOC_0502g06670	Ox02g06670.1: retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed	TalBA5.PX035	6	0.450726637	8.04750661	3.26606798	0	1	2	1	1	3	7
LOC_0503g5530	Ox03g5530.1: HLS, putative, expressed	TalBA5.PX035	3	1.08493806	2.364868285	1.9283255	1	0	2	1	1	3	7
LOC_0503g5530	Ox03g5530.1: HLS, putative, expressed	TalBA2.Xoo.PX083	3	0.302374285	0.788280622	0.53941903	0	0	2	1	1	3	6
LOC_0503g5530	Ox03g5530.1: HLS, putative, expressed	TalBA4.ICMP3125	3	0.37803675	0.96794009	0.61752211	0	0	2	1	1	3	6
LOC_0504g43560	Ox04g43560.1: no apical meristem protein, putative, expressed	TalBA5.PX035	1	0.31763408	2.07272591	2.17236027	0	0	0	1	1	3	4
LOC_0509g27580	Ox09g27580.3: potassium transporter, putative, expressed	TalBA5.PX035	13	0.316941464	0.652413026	1.16612466	0	0	0	1	1	3	4
LOC_0510g04540	Ox10g04540.1: expressed protein	TalBA4.ICMP3125	18	0.506313789	0.914016378	0.93316345	0	0	0	1	1	3	4
LOC_0511g42950.1	Ox11g42950.1: expressed protein	TalBA2.Xoo.PX083	68	0.936429764	3.089556103	2.99651456	1	1	2	0	0	4	8
LOC_0511g42950	Ox11g42950.1: expressed protein	TalBA4.ICMP3125	68	1.6791619939	4.385046464	4.34147578	1	1	2	0	0	4	8
TalCA	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0501g65510	Ox01g65510.1: homeobox domain containing protein, expressed	TalCA1.Xoo.PX083	4	0.578238936	8.957554784	3.0908921	0	1	0	1	1	3	5
TalAN	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0501g650370	Ox01g650370.1: STE_MERK_ste11_MAP3K.4 - STE kinases include homologue to sterile 7, sterile	TalAN5.ICMP3125	1	0.449576283	0.774178933	0.96384033	0	0	0	1	1	3	4
TalAH	Transcript ID	TALES-Strain	Ranks	log2>FoldChange	fcfMLE	fcfmed	log2 > 0.6	fcfmed > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
LOC_0511g26790	Ox11g26790.1: dehydrin, putative, expressed	TalAH6.PX035	1	0.413360029	3.442394713	1.51544388	0	0	0	1	1	3	4
LOC_0503g43670.1	Ox03g43670.1: TL_IRAK_CRR1L1 - The CRR1L1 subfamily has homology with Crinkly4, expressed	TalAH6.PX035	11	0.3081485292	0.492266069	0.55312343	0	0	0	1	1	3	4

Tabelle 3.3.5.2 Potentielle Zielgene mit einem score von mindestens 4, identifiziert mit Hilfe der RNAseq-Analyse. (Fortsetzung auf der nächsten Seite.)

Um zu überprüfen ob diese Gene wirklich in Abhängigkeit des *Xanthomonas*-Stammes induziert werden, wurden zunächst die Proben, welche für die RNAseq-Analyse verwendet wurden, mit Hilfe einer qRT-PCR überprüft. Dafür wurden als erstes die TALEs TalAO und TalAQ ausgewählt, da die potentiellen Zielgene die besten scores aufweisen und in 14 bzw. 13 bisher vollständig sequenzierten *Xoo*-Stämmen vorhanden sind (Tab. 3.3.4). In Abbildung 3.3.5.3 ist das Ergebnis der qRT-PCR für die Infektion von Reispflanzen mit den Stämmen PXO83, PXO35, PXO142 und ICMP3125 dargestellt. Es wurden die potentiellen Zielgene von TalAO, *Os02g40410* und *Os06g29790* und von TalAQ, *Os03g03034*, mit jeweils einem score von 8, untersucht.

Bei der Infektion mit allen vier Stämmen, kann eine Induktion für das potentielle Zielgen von TalAO *Os02g40410* verzeichnet werden (Abb. 3.3.5.3A). Dabei variieren die Induktionslevel von rund 4-62-facher Induktion, je nach Stamm bzw. Experiment. Die größte Induktion des Gens *Os02g40410* ist bei dem Stamm ICMP3125 mit rund 22-facher Induktion im Vergleich zur $MgCl_2$ -Kontrolle zu erkennen. Für das potentielle Zielgen *Os06g29790* von TalAO verhält es sich ähnlich. Auch für dieses Gen ist eine Induktion des Gens nach Infektion mit allen vier Stämmen, welche den TalAO besitzen, nachweisbar (Abb. 3.3.5.3B). Die Induktionslevel variieren auch hier je nach Stamm von 5-28-facher Induktion. Mit 28-facher Induktion ist auch für dieses Gen bei dem Stamm ICMP3125 die größte Induktion messbar.

Für das potentielle Zielgen *Os03g03034* von TalAQ, ist nach der Infektion mit drei der vier Stämme eine Induktion des Gens nachweisbar (Abb. 3.3.5.3C). Dabei ist eine moderate Induktion des Gens von 2 bis 8-facher Induktion, für die Stämme PXO83, PXO35 und ICMP3125 zu verzeichnen. Die größte Induktionsrate mit 8-facher Induktion kann bei dem Stamm PXO35 beobachtet werden (Abb. 3.3.5.3C). Für den Stamm PXO142 ist keine Induktion nachweisbar. Dies konnte erwartet werden, da dieser Stamm keine funktionale Kopie des *TalAQ* Gens besitzt. Somit konnte der Stamm PXO142 in diesem Experiment als Negativkontrolle fungieren. Daher kann man schlussfolgern, dass es wahrscheinlich ist, dass das Gen *Os03g03034* ein Zielgen von TalAQ ist.

Um zu testen ob mittels qRT-PCR-Analyse eine Expression von Genen mit einem Zielgen-score von 4 nachgewiesen werden kann, wurde das potentielle Zielgen *Os04g05050* für TalAB getestet. Auch für dieses potentielle Zielgen von TalAB, konnte nach der Infektion mit allen Stämmen eine Induktion der Expression festgestellt werden (Abb. 3.3.5.3.D). Hierbei ist jedoch auffällig, dass die Induktionsrate von PXO35, von ca. 40-facher Induktion, im Vergleich mit den Stämmen PXO83, PXO142 und ICMP3125 ungefähr 10-mal so hoch ist (Abb. 3.3.5.3.D). Dies spiegelt sich ebenfalls in den RNAseq-Daten wider. Das Gen *Os04g05050* konnte dort für die Infektion mit den Stämmen PXO35 und ICMP3125 identifiziert werden. Dabei wies auch hier die Infektion mit PXO35 im Vergleich

zu ICMP3125 eine höhere Induktionsrate auf. Daher ergibt sich auch nur für die Infektion mit PXO35 ein Zielgen-score von 4. Der Zielgen-score, für die Infektion mit ICMP3125, liegt bei 3. Jedoch ist sowohl bei ICMP3125 als auch bei den Stämmen PXO83 und PXO142 eine leichte Erhöhung der Expression nachweisbar. Somit könnte zum einen das Gen *Os04g05050* ein Zielgen für den TalAB sein und zum anderen könnten im Allgemeinen, Gene mit einem Zielgen-score von 4 durchaus Zielgene für die korrespondierenden TALEs sein. Zusammenfassend kann man sagen, dass die potentiellen Zielgene mit einem score von 5-8 in der Tabelle 3.3.5.3. sehr gute Kandidaten als Zielgene der entsprechenden TALEs sind.

3.3.5.4 Validierung von potentiellen Zielgenen von TALEs

Für die Bestätigung der potentiellen Zielgene die in Abschnitt 3.3.5.3 identifiziert wurden ist es notwendig, die TALEs alleine in einem *Xoo*-Stamm zu testen. Da es aufgrund ihrer repetitiven Struktur sehr schwierig und aufwendig ist, TALEs direkt aus dem Genom von *Xanthomonas* zu klonieren, wurden die natürlichen TALEs mit Hilfe der *Golden TAL Technology* nachgebaut. Dafür wurden als erstes neue Golden-Gate-Module für die N- und C-terminalen Bereiche aus *Xoo* kloniert. Damit sollte ein möglicher negativer Einfluss, der normalerweise genutzten N- und C-terminalen Bereiche, des TALEs Hax3, auf die Aktivität der TALEs in Reis minimiert werden. Da der *Xanthomonas*-Stamm, aus welchem Hax3 stammt, *Brassicaceae*n befällt und nicht Reis, sollten auf diese Weise die nachgebauten TALEs so nahe wie möglich am natürlichen System sein. Mit dem N-terminalen Bereich von TalAG und dem C-terminalen Bereich von TalAO wurden die TALEs von PXO83 nachgebaut. In Tabelle 3.3.5.4 ist eine Übersicht über die nachgebauten TALEs sowie deren RVD-Sequenz zu sehen.

Um die TALE-abhängige Induktion der Gene, welche mit Hilfe der RNAseq Daten identifiziert wurden, nachzuweisen, müssen die nachgebauten TALEs in einem *Xoo*-Stamm getestet werden, welcher keine TALEs besitzt. Solch ein Stamm ist der amerikanische *Xoo*-Stamm Roth1-8, welcher auf Reis nur moderat virulent ist (Jana Streubel, nicht publiziert). Testet man die künstlich erstellten TALEs, kurz artTals genannt (Tab. 3.3.5.4), auf diese Weise, so kann man das Risiko minimieren, dass die ermittelte Induktion der Gene von anderen TALEs beeinflusst wird. Für die Transformation des *Xoo*-Stammes Roth1-8 wurde dieser gegenüber dem Antibiotikum Rifampicin resistent gemacht und bekam den Namen Roth1-8r. Die klonierten artTals wurden dann in den *Xoo*-Stamm Roth1-8r transformiert. Die erfolgreiche Transformation wurde mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse überprüft.

Transcript ID	TALEs Strain	Ranks	log2FoldChange	lfcMLE	lfc.med	log2 > 0.6	lfc.med > 2.5	> 1 stamm	rank: under top 50	rank: under top 20	score	von Punkten
TalAQ (AvrXz23)												
LOC_Os03g03034.2	TalAQ3.Xoo.PX083	5	0.723322049	2.067042219	2.54943035	1	1	2	1	3	3	8
LOC_Os03g03034.1	TalAQ3.Xoo.PX083	6	0.723322049	2.067042219	2.54943035	1	1	2	1	3	3	8
LOC_Os03g03034.3	TalAQ3.Xoo.PX083	7	0.723322049	2.067042219	2.54943035	1	1	2	1	3	3	8
LOC_Os03g03034.4	TalAQ3.Xoo.PX083	8	0.723322049	2.067042219	2.54943035	1	1	2	1	3	3	8
LOC_Os03g03034.5	TalAQ3.Xoo.PX083	24	0.794112788	2.199400931	2.53169692	1	1	2	1	0	0	5
LOC_Os03g03034.1	TalAQ5.ICMP3125	25	0.794112788	2.199400931	2.53169692	1	1	2	1	0	0	5
LOC_Os03g03034.2	TalAQ5.ICMP3125	26	0.794112788	2.199400931	2.53169692	1	1	2	1	0	0	5
LOC_Os03g03034.3	TalAQ5.ICMP3125	27	0.794112788	2.199400931	2.53169692	1	1	2	1	0	0	5
LOC_Os03g03034.4	TalAQ5.ICMP3125	24	1.683102172	3.874466036	3.95790278	1	1	2	1	0	0	5
TalAO (AvrXz27)												
LOC_Os02g4004.0	TalAO7.PX035	1	1.121182243	4.236511334	4.31551798	1	1	2	1	3	3	8
LOC_Os06g29790.1	TalAO7.PX035	5	1.43492826	3.036473549	3.15168487	1	1	2	1	3	3	8
LOC_Os06g29790.2	TalAO6.PX0142	2	0.570719209	1.428380196	1.39949643	0	0	2	1	3	3	6
LOC_Os06g29790.3	TalAO5.ICMP3125	42	1.383678481	2.950791737	2.9243878	1	1	2	1	0	0	5
TalAE												
LOC_Os08g05910.1	TalAE5.PX035	2	0.83347633	1.136404424	1.26114992	1	1	2	1	3	3	7
LOC_Os08g05910.2	TalAE9.PX035	1	0.83347633	1.136404424	1.26114992	1	1	2	1	3	3	7
LOC_Os08g05910.1	TalAE9.PX083	2	0.36631372	0.507482704	0.60091158	0	0	2	1	3	3	6
LOC_Os08g05910.1	TalAE5.ICMP3125	2	0.502786508	0.693313102	0.94958111	0	0	2	1	3	3	6
LOC_Os08g05910.1	TalAE4.Xoo.PX083	1	0.36631372	0.507482704	0.60091158	0	0	2	1	3	3	6
LOC_Os08g05910.2	TalAE6.ICMP3125	1	0.502786508	0.693313102	0.94958111	0	0	2	1	3	3	6
TalBA												
LOC_Os03g55530.1	TalBA5.PX035	3	1.084493806	2.364686285	1.92363255	1	1	2	1	3	3	7
LOC_Os03g55530.2	TalBA2.Xoo.PX083	3	0.302374285	0.788280622	0.53941903	0	0	2	1	3	3	6
LOC_Os03g55530.3	TalBA4.ICMP3125	3	0.37803675	0.963794009	0.61752211	0	0	2	1	3	3	6
TalCA												
LOC_Os01g63510.1	TalCA1.Xoo.PX083	4	0.578238926	8.957554784	3.0508921	0	1	0	1	3	3	5
TalAB												
LOC_Os08g07760.1	TalAB7.ICMP3125	3	0.461019429	0.580910294	0.71622882	0	1	2	1	3	3	6
LOC_Os08g07760.2	TalAB9.PX035	1	0.37834099	0.47743497	0.52401377	0	0	2	1	3	3	6
TalAA												
LOC_Os01g40290.1	TalAA7.ICMP3125	1	0.662288019	2.860178556	2.71726433	1	1	0	1	3	3	6
TalAL												
LOC_Os02g10010.1	TalAL6.PX035	2	1.256896548	1.727341501	1.7965374	1	1	0	1	3	3	5
LOC_Os02g10010.2	TalAL6.PX035	1	1.256896548	1.727341501	1.7965374	1	1	0	1	3	3	5
LOC_Os02g51110.1	TalAL5.PX035, TalAL1_91	1	0.821038894	1.722913205	2.12513157	1	1	0	1	3	3	5
TalAD												
LOC_Os03g51760.1	TalAD7.ICMP3125	16	0.474098862	3.582369087	3.47020351	0	1	0	1	3	3	5

Tabelle 3.3.5.3 Top-Kandidaten-Liste der potentiellen Zielgene für Xoo-TALEs.

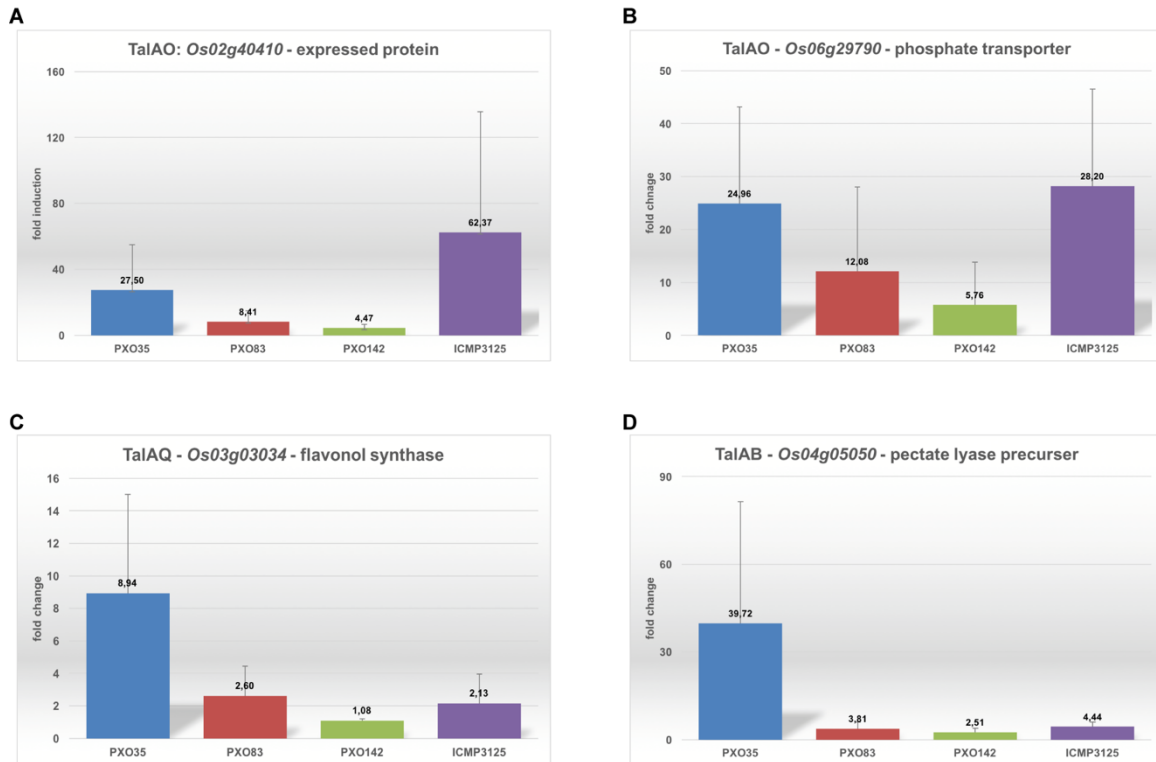


Abbildung 3.3.5.3 Validierung ausgesuchter potentieller Zielgene von TalAO, TalAQ und TalAB. Zur Analyse der Expressionslevel potentieller Zielgene, wurden die RNA-Proben, welche für die RNAseq-Analyse verwendet wurden, getestet. Die RNA wurde mit Hilfe des „Maxima First Strand cDNA Synthesis“ Kit von Thermo Fisher in cDNA umgeschrieben. Die Menge an *Os02g40410* (TalAO), *Os06g29790* (TalAO), *Os03g03034* (TalAQ) und *Os04g05050* (TalAB) Transkript wurde mit Hilfe von qRT-PCR bestimmt. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Bei diesem Experiment wurde die Expression der artTals in dem *Xanthomonas*-Stamm Roth1-8r getestet. Wie in Abbildung 3.3.5.4 dargestellt ist, ist für alle artTals ein Signal mit der erwarteten Größe zu erkennen (Abb. 3.3.5.4C). Nur der artTalAG weist ein Signal mit einer zu geringen Größe auf. Dies lässt darauf schließen, dass der artTalAG womöglich nicht korrekt kloniert wurde.

TALE	Name	RVD-Sequenz	# repeats	kDa	Xoo- Stamm	TALE-Cluster
AA5	artTalAA	NI-HG-NS-HG-HG-HD-NS-NG-HD-NN-NG-HG-NG-HD-HG-HD-HD-NI-NN-NG	19,5	131,4	PXO83	T-V
AB5	artTalAB	NI-HG-NI-NI-NI-NN-HD-NS-NN-NS-NN-HD-NN-NI-HD-NN-NS-NG	17,5	124,6	PXO83	T-VIII
AF4	artTalAF	NI-NN-NN-NI-NI-NI-HD-NS-HG-NN-NN-NN-NI-NI-NG-HD	15,5	117,5	PXO83	T-VIII
AG4	artTalAG	NI-NG-NN-NG-NK-NG-NI-NN-NI-NN-NI-NN-NS-NG-NS-NN-NI-N*-NS-NG	19,5	131,4	PXO83	T-II
AH2	artTalAH	NI-N*-NI-NS-NN-NG-NN-NS-N*-NS-NN-NS-N*-HD-HG-HD-NI-HD-HD-NG	19,5	131,3	MAFF311018	T-V
AN3	artTalAN	NI-N*-NI-HG-NI-NI-NS-HD-NN-HD-NS-NG-SS-HD-NI-NI-NN-NI-NN-NS-NG	20,5	134,9	PXO83	T-VI
AQ3	artTalAO	NI NN N* NG NS NN NN NI NN NI N* HD HD NI NG NG	16,5	120,7	PXO83	T-IX
AP3	artTalAP	HD HD HD NG N* NN HD HD N* NI NI NN HD HI ND HD NI HD NG NG	19,5	131,6	PXO83	T-IX
AQ3	artTalAQ	HD HD NN NN NS NG HD S* HG HD NG N* HD HD HD N* NN NI NN HD HI ND HD HG NN HG N*	25,5	159,8	PXO83	T-IX
BA2	artTalBA	NI-NS-HD-HG-NS-NN-HD-H*-NG-NN-NN-HD-HD-NG-HD-NG	15,5	117,4	PXO83	T-V
BM1	artTalBM	NI-NG-NI-NI-N*-NG-HD-HD-N*-NI-NI-NI-HD-NG-HD-HG-NN-NS-NN-HD-HD-NG-N*	22,5	141,9	PXO99	T-I
BX1	artTalBX	NN-HD-NI-HG-HD-NG-N*-HD-HD-NI-NG-NG-NI-HD-NG-NN-NG-NI-NI-NI-NI-N*-NS-NG	23,5	145,4	PXO99	T-II
CA1	artTalCA	NI N* NI NS NN NG NN HD HD NG HD NS HD N* NS NG	16,5	120,8	PXO83	T-VI

Tabelle 3.3.5.4 Übersicht über die nachgebauten TALEs.

Insgesamt konnten 12 TALEs aus *Xanthomonas oryzae* erfolgreich nachgebaut und in den Stamm Roth1-8r transformiert werden. Die Expression der Effektoren konnte mit Hilfe der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Somit stehen diese Roth1-8r-Stämme mit den artTALS für weitere Experimente zur Verfügung.

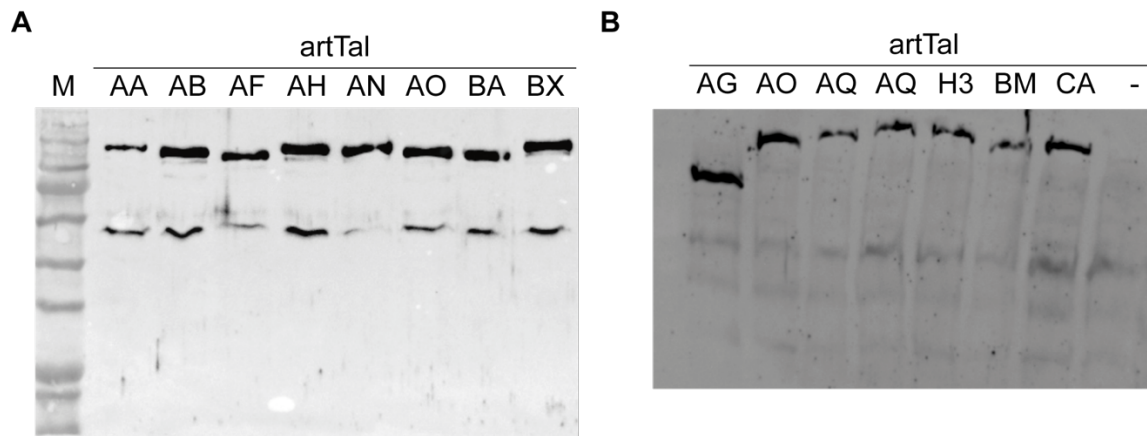


Abbildung 3.3.5.4 Nachweis der nachgebauten TALEs in dem Xoo-Stamm Roth1-8r.

Um die Expression der TALEs in dem Xoo-Stamm Roth1-8 zu überprüfen, wurden die TALE-Proteine mittels Immunoblot nachgewiesen. Die artifizialen TALE-Konstrukte wurden in den Vektor pSKX1 kloniert, welcher eine *lac* Promotor gesteuerte konstitutive Expression in *Xanthomonas* und eine C-terminale Fusion mit einem FLAG-Epitop erlaubt. Die *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Stämme, welche die artTals tragen, wurden in PSA Medium angezogen. Es wurde 1ml einer Bakterien-Suspension mit einer OD₆₀₀ von 0,2 geerntet und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Der TALE Hax3 (H3) fungierte bei **B** als Positivkontrolle. Die erwarteten Größen in kDA der einzelnen artTALs sind in Tabelle 3.3.5.4. zusammengefasst.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten, in Kooperation mit zwei Arbeitsgruppen vom IRD und CIRAD in Montpellier (Frankreich), Reispflanzen generiert werden, welche resistent gegenüber einer Infektion mit bestimmten *Xanthomonas*-Stämmen sind. Dafür wurden zwei TALEN-Paare verwendet. Außerdem wurde versucht, die Zwei-Protein-Strategie der TALEN-Technologie durch die Erstellung von *single-chain*-TALEN zu vereinfachen. Dafür wurden scTALEN erstellt, welche DNA *in vitro* spalten können. Allerdings konnte keine *in planta* Aktivität für die erstellten scTALEN nachgewiesen werden. Weiterhin wurden vier *Xanthomonas*-Stämme im Hinblick auf ihr TALE-Repertoire analysiert sowie potenzielle Ziel-Gene von TALEs identifiziert.

4.1 Generierung resistenter Reispflanzen mit Hilfe von TALEN

Mit Hilfe der in dieser Arbeit erstellten TALEN, konnte der Promotor eines der wichtigsten Suszeptibilitätsgene von Reis, durch unsere Kooperationspartner vom IRD und CIRAD in Montpellier, erfolgreich an zwei verschiedenen Stellen editiert werden (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016). In dieser Arbeit wurden drei der editierten Linien im Hinblick auf ihre Resistenz gegenüber Infektionen mit bestimmten *Xoo*-Stämmen getestet (Abb. 3.1.3). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Reis-Linie bei der die *talC*-Box, als auch die Reislinie bei der die *AvrXa7*-Box mutiert wurden, keine Krankheitssymptome aufweisen, wenn sie mit einem *Xoo*-Stamm, welcher den korrespondierenden TALE besitzt, infiziert wird.

4.1.1 Analyse der editierten *Kitaake*-Linien

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Analysen der *Kitaake*-Linien *sweet14-10* und *sweet14-11*, bei denen die *AvrXa7*-Bindestelle mutiert wurde, stimmen die Ergebnisse der Analyse der Linie *sweet14-32* nicht mit denen unserer Kooperationspartner in der Studie Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016 überein.

Die *Kitaake*-Linie *sweet14-32* wurde in der TAL-Bindestelle des TALEs *TalC*, aus dem *Xoo*-Stamm BAI3, editiert und dabei 24bp deletiert (Abb. 3.1.3A). Somit sollte die Linie *sweet14-32* resistent gegenüber einer Infektion des *Xoo*-Stamms BAI3 sein. Das in dieser Arbeit durchgeführte Inokulationsexperiment der Linie *sweet14-32* mit dem *Xoo*-Stamm BAI3 zeigte, dass BAI3 hier keine Virulenzsymptome auf der *Kitaake*-Linie *sweet14-32* auslöst (Abb. 3.1.3B). Auch eine Komplementationsmutante, bei der das *talC*-Gen von einem Plasmid in einer *talC*-Deletionsmutante exprimiert wird, konnte keine Virulenzsymptome auslösen (Abb. 3.1.3B). Somit ist es möglich, dass *sweet14-32* in diesen Experimenten, resistent gegenüber BAI3-Infektionen ist. In der Studie Blanvillain-

Baufumé *et al.*, 2016 verhält es sich anders. Dort wurde gezeigt, dass BAI3, bei einer Infektion der Linie sweet14-32, weiterhin Virulenzsymptome auslösen kann. Dies konnte sowohl, wie in dieser Arbeit, bei Inokulationsexperimenten (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016; Abb. 4C) als auch bei *leaf-clipping*-Experimenten gezeigt werden (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016); Abb. 3C). Bei den Experimenten in der Studie von Blanvillain-Baufumé *et al.*, wurde festgestellt, dass der Stamm BAI3 Δ *talC*, welcher kein funktionales *talC*-Gen besitzt (Insertionsmutante), keine Virulenzsymptome auslöst. Zum einen besitzt dieser Stamm den Schlüssel-Virulenz-Faktor TalC nicht und zum anderen wurde die Linie sweet14-32 in der TALE-Bindestelle von TalC mutiert, sodass der TALE nicht länger binden und das Gen *OsSWEET14* induzieren sollte. Bei der Infektion mit BAI3, welcher theoretisch ebenfalls keine Virulenzsymptome auslösen sollte, da der TALE TalC nicht im Promotor von *OsSWEET14* binden kann, konnten jedoch Virulenzsymptome beobachtet werden (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016).

Die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die Resistenz der Linie sweet14-32 gegenüber BAI3 in dieser Arbeit und in der Arbeit Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016 kann verschiedene Gründe haben. So waren die Gewächshausbedingungen, unter denen die Reispflanzen angezogen und infiziert worden sind, zwischen den beiden Arbeiten unterschiedlich. In der Arbeit von Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016 wurden die Pflanzen bei höherer Luftfeuchtigkeit und höherer Temperatur angezogen als bei den Experimenten in dieser Arbeit. So ist es möglich, dass die Pflanzen und Bakterien unter diesen Bedingungen unterschiedlich reagieren. Auch die höhere Luftfeuchtigkeit und Temperatur könnte ein Grund sein, dass die *Xanthomonaden* vitaler und somit auch virulenter sind. Das Inokulationsexperiment in dieser Arbeit konnte nur zweimal durchgeführt werden, daher ist es notwendig, dass das Experiment wiederholt wird. Somit kann überprüft werden, ob die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse bestätigt werden können. Zusätzlich sollten, wie in der Arbeit von Blanvillain-Baufumé und Kollegen, *leaf-clipping*-Experimente mit den *Kitaake*-Linien sweet14-10, sweet14-11 und vor allem sweet14-32 durchgeführt werden. Auf diese Weise können die hier untersuchten *Kitaake*-Linien genauer auf ihre Reaktionen bei Infektionen mit *Xoo*-Stämmen analysiert werden.

Bei den Experimenten mit der *Kitaake*-Linie sweet14-32 in der Studie von Blanvillain-Baufumé *et al.* wurden die *Xoo*-Stämme BAI3 und BAI3 Δ *talC* getestet (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016). Es wurden keine Experimente mit dem *Xoo*-Stamm BAI3 Δ *talC*+*talC* (Komplementationsmutante), bei dem die *talC*-Mutation komplementiert wird, durchgeführt. Die Autoren in der Studie Blanvillain-Baufumé *et al.* spekulieren, dass aufgrund der erhaltenen Virulenz von BAI3 der TALE TalC ein weiteres, bisher unbekanntes, wichtiges Suszeptibilitätsgen als Ziel haben könnte (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016). Um dies zu überprüfen, könnte ein Test von dem *Xoo*-Stamm BAI3 Δ *talC*+*talC*

mit der *Kitaake*-Linie sweet14-32 durchgeführt werden. Mit dem Test der Komplementationsmutante könnte man ausschließen, dass es ein Problem mit der Deletionsmutante BAI3 Δ *talC* gibt. Aufgrund der hohen Homologie zwischen *tal*-Genen ist es möglich, dass bei der Generierung des Stammes BAI3 Δ *talC* ein weiteres *tal*-Gen zerstört wurde. Ist dies der Fall, so wäre der Wildtyp-Stamm BAI3 auf der Linie sweet14-32 virulent. Die Deletionsmutante BAI3 Δ *talC* jedoch nicht. Testet man nun die Komplementationsmutante BAI3 Δ *talC*+*talC* und dieser Stamm wäre nicht virulent auf der Linie sweet14-32, dann könnte ein anderer TALE oder Effektor für die erhaltene Virulenz verantwortlich sein. Ist der Stamm BAI3 Δ *talC*+*talC* ebenfalls, genau wie der Wildtyp-Stamm BAI3, virulent auf der Linie sweet14-32, dann ist es wahrscheinlich, dass der TALE TalC ein weiteres bisher unbekanntes aber wichtiges Zielgen für die Virulenz von BAI3 hat. Somit sollte man die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wiederholen und weitere Experimente, wie *leaf-clipping*-Experimente mit den Stämmen BAI3, BAI3 Δ *talC* und BAI3 Δ *talC*+*talC* auf der Linie sweet14-32 durchführen.

4.1.2 Resistenter Reis mit Hilfe von dominanten Resistenzgenen

In dieser Arbeit wurden TALEN generiert, mit deren Hilfe unsere Kooperationspartner am IRD und CIRAD in Montpellier (Frankreich) Reispflanzen editieren konnten. Es wurden Mutationen in TALE-Bindestellen im Promotorbereich des Gens *OsSWEET14* eingefügt. Auf diese Weise wurde aus dem Suszeptibilitätsgen *OsSWEET14* ein rezessives Resistenzgen und die Reispflanzen resistent gegenüber Infektionen von bestimmten *Xoo*-Stämmen (Blanvillain-Baufumé *et al.*, 2016).

4.1.2.1 Nutzung von natürlich vorkommenden dominanten Resistenzgenen

Um Reispflanzen resistent gegenüber Infektionen von *Xanthomonas*-Stämmen zu machen, können auch dominante Resistenzgene genutzt werden. Beispiele für solche dominanten Resistenzgene aus Reis sind *Xa10*, *Xa23* oder *Xa27* (Kapitel 1.3.3.2, Abb. 1.3.1.B). Diese Resistenzgene funktionieren als Promotorfallen. Der entsprechende TALE AvrXa7 (TalAC), AvrXa10 (TalBJ), AvrXa23 (TalAQ) oder AvrXa27 (TalAO) bindet im Promotorbereich und induziert die Gene (Vera Cruz *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2004; Romer *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014b; Zhang *et al.*, 2015). Daraufhin wird eine Resistenzreaktion ausgelöst. Möchte man eine Reis-Linie nun resistent machen, so kann man diese dominanten Resistenzgene nutzen (Vera Cruz *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Hat man eine Reis-Linie, welche suszeptibel gegenüber Infektionen von einem *Xoo*-Stamm ist, welcher den TALE AvrXa7 (TalAC) hat, könnte man das dominante Resistenzgen *Xa7* in die gewünschte Reis-Linie kreuzen. Ist das geschafft, so erkennt die Promotorfalle eine Infektion des *Xoo*-Stammes

und löst eine Resistenzreaktion aus. Die Reispflanzen sind resistent. Da der TALE AvrXa7 (TalAC) in den 15, in dieser Arbeit untersuchten, *Xoo*-Stämmen nur in 6 Stämmen vorkommt, wären diese Reispflanzen nur gegen Infektionen dieser 6 Stämme (KACC10331, MAFF311018, PXO83, PXO86, PXO145, PXO236 und PXO524; Tab. 3.3.4) resistent. Eine breite Resistenz der Reispflanzen könnte man erreichen, indem man ein dominantes Resistenzgen gegen eine Gruppe von TALE (Kapitel 3.3.4, Tab. 3.3.4) nutzt. So könnte man das Resistenzgen *Xa23* nutzen, welches eine Resistenz gegen *Xoo*-Stämme mit dem TALE AvrXa23 (TalAQ) vermittelt. Der TALE AvrXa23 (TalAQ) kommt in 14 der 15 untersuchten *Xoo*-Stämmen vor. Kreuzt man das *Xa23*-Gen in eine Reislinie, so bekommt man eine Reispflanze, welche gegen ein breites Spektrum von *Xoo*-Stämmen resistent ist.

Die dominanten Resistenzgene *Xa10*, *Xa27*, *Xa23* und *Xa7* werden bereits in verschiedenen Züchtungsprogrammen von Reis genutzt (Vera Cruz *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2013). Dabei ist jedoch die Frage, wie stabil sind diese Resistenzen? Bakterien können sich, durch den Verlust von Avirulenzgenen, bei hohem Selektionsdruck sehr schnell anpassen um die Erkennung durch Resistenzgene zu umgehen (Koskiniemi *et al.*, 2012). So etwas kann auch bei TALEs beobachtet werden. Die Deletion von einigen *repeats* bei dem TALE AvrBs3 führt dazu, dass dieser nicht mehr in der Lage ist, das dominante Resistenzgen *Bs3* zu induzieren (Römer *et al.*, 2007). Die Nutzung eines Resistenzgens gegen einen TALE, welcher ein Schlüssel-Virulenz-Faktor für *Xoo* ist, könnte die Anpassung und Überwindung der Resistenz unwahrscheinlicher machen. Ein solches Resistenzgen ist *Xa7*. Der TALE AvrXa7 (TalAC) ist für die *Xoo*-Stämme ein Schlüssel-Virulenz-Faktor. Die Induktion von *OsSWEET14* ist essentiell für die Virulenz dieser *Xoo*-Stämme. Tatsächlich konnte in Feldtests auf den Philippinen gezeigt werden, dass die *Xa7* vermittelte Resistenz dauerhaft sein kann (Vera Cruz *et al.*, 2000). Jedoch ist es auch hier denkbar, dass die *Xoo*-Stämme diese Resistenz überwinden können. So könnten sie zum Beispiel durch Rekombination oder horizontalen-Gentransfer einen anderen TALE erwerben, welcher ein anderes *OsSWEET*-Gen induziert oder an einer anderen Stelle im Promotor von *OsSWEET14* bindet und dieses induziert. Beispiele für *Xoo*-Stämme, welche zwei TALEs haben die ein Schlüssel-Suszeptibilitätsgen der *OsSWEET*-Genfamilie induzieren können, sind die Stämme MAFF311018, PXO524 und PXO236. Diese *Xoo*-Stämme besitzen die TALEs PthXo2 (TalAM), welcher *OsSWEET12* induziert und AvrXa7 (TalAC), welcher *OsSWEET14* induziert (Kapitel 3.3.3, Tab. 3.3.4). Eventuell besitzen diese Stämme zwei *OsSWEET*-induzierende TALEs um bei bestimmten Reis-Linien rezessive Resistenzen zu umgehen.

4.1.2.2 Nutzung von dominanten Resistenzgenen mit Super-Promotoren

Dominante Resistenzgene haben trotz der genannten Nachteile natürlicher Resistenzgene ein enormes Potential für die Züchtung und Generierung von resistenten Reispflanzen. Für TALE-assoziierte Pflanzenkrankheiten können Resistenzgene mit sogenannten Super-Promotoren generiert werden. Dabei werden mehrere TALE-Bindestellen in den Promotorbereich eines dominanten Resistenzgens kloniert. An jede dieser TALE-Bindestellen kann ein anderer TALE binden. Auf diese Weise kann man resistente Reispflanzen gegen eine breite Masse von *Xanthomonaden* erzeugen (Römer *et al.*, 2009; Hummel *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2015).

So wurde ein solcher Super-Promotor, welcher sechs TALE-Bindestellen von *Xoo* und *Xoc* TALEs enthält, vor das Resistenzgen *Xa27* fusioniert. Es konnte gezeigt werden, dass die Pflanzen mit diesem Resistenzgen gegen eine ganze Reihe von *Xoo* und *Xoc*-Stämmen resistent sind (Hummel *et al.*, 2012). In einem ähnlichen Ansatz konnte gezeigt werden, dass transgene Reispflanzen mit dem *Xa10^{E5}*-Gen gegenüber 27 von 28 getesteten *Xoo*-Stämmen aus 11 verschiedenen Ländern resistent sind (Zeng *et al.*, 2015). Dabei enthält der Promotor des *Xa10^{E5}*-Gens TALE-Bindestellen für die TALEs *AvrXa10* (TalBJ), *AvrXa27* (TalAO), *PthXo1* (TalBX), *PthXo6* (TalAR) und *PthXo7* (TalBM). Die Auswahl der TALE-Bindestellen im Promotor des *Xa10^{E5}*-Gens ist sehr vorteilhaft. Mit den TALEs *AvrXa27* (TalAO) und *PthXo6* (TalAR) wurden zwei Gruppe 1 TALEs ausgewählt, welche in mindestens 13 der 15 hier untersuchten Stämme vorhanden sind. Des Weiteren ist der TALE *AvrXa10* (TalBJ) ein Gruppe 2 TALE und somit auch weit verbreitet unter den *Xoo*-Stämmen. Die anderen zwei TALEs induzieren wichtige Suszeptibilitätsgene wie *OsSWEET11* (PthX01/TalBX) oder *OsTFIIA_γ1* (PthXo7/TalBM). Somit ist es nicht verwunderlich, dass das *Xa10^{E5}*-Gen in transgenen Reispflanzen gegen viele *Xoo*-Stämme Resistenz vermittelt (Zeng *et al.*, 2015). Somit könnten Reispflanzen bei einer guten Auswahl von TALE-Bindestellen, welche vor ein dominantes Resistenzgen fusioniert werden, nachhaltig gegen eine Vielzahl von *Xanthomonas*-Stämme resistent gemacht werden.

4.1.3 Resistenter Reis mit Hilfe neuer *Genome Editing* Werkzeuge

Zu Beginn dieser Arbeit gab es drei große Gruppen von *Genome Editing* Werkzeugen, die Meganukleasen, die Zink-Finger-Nukleasen (ZFN) und die TALE-Nukleasen (TALEN). Im Laufe dieser Arbeit kam eine weitere große Gruppe von *Genome Editing* Werkzeugen hinzu, die *RNA guided nucleases* (RGN). Im Gegensatz zu den anderen *Genome Editing* Werkzeugen, wird die DNA-Bindung bei den RGNs über eine RNA und nicht über ein Protein vermittelt. Im Folgenden werden die Techniken CRISPR/Cas9 und CRISPR/Cpf1 näher beleuchtet.

4.1.3.1 *Genome Editing* mit Hilfe von CRISPR/Cas9 in Reis

Das CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9-System ist sozusagen ein adaptives Immunsystem von Bakterien und Archaea gegen eindringende Viren, Phagen und Plasmide (Barrangou *et al.*, 2007; Marraffini & Sontheimer, 2008; Garneau *et al.*, 2010; Wiedenheft *et al.*, 2012). Der Abwehrmechanismus besteht aus einem Mehrschrittprozess und basiert auf der Erkennung von Fremd-DNA durch kleine RNAs (Abb. 4.1.3A). Ein CRISPR-Locus besteht dabei aus mehreren CRISPR assoziierten (Cas) Proteinen und einem sogenannten CRISPR-Array. Diese CRISPR-Arrays bestehen aus kurzen Fremd-DNA-Abschnitten (*spacer*), welche durch kurze Sequenzwiederholungen (*repeats*) getrennt werden (Abb. 4.1.3A). Die Fremd-DNA-Abschnitte werden bei Infektionen von Viren, Phagen oder Plasmiden, durch Rekombination, in das Bakterien-Genom übernommen (Gasiunas *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2013). Später erkennen sie als *spacer* die Fremd-DNA (Ziel-DNA). Tritt zum Beispiel virale DNA in eine Bakterienzelle ein, so wird der CRISPR-Locus aktiviert. Die Cas-Proteine werden exprimiert und der CRISPR-Array wird transkribiert. Zunächst wird eine Vorläufer-RNA transkribiert, welche in kleinere CRISPR-RNAs (crRNA) prozessiert wird (Bhaya *et al.*, 2011; Gasiunas *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2013).

Die crRNA bildet zusammen mit einer weiteren kurzen RNA, der tracrRNA, und Cas-Nuklease-Proteinen einen Komplex (Bhaya *et al.*, 2011). Die crRNA dirigiert nun die Nuklease-Proteine zu der Fremd-DNA und bindet diese (Abb. 4.1.3A). Die Bindung der Fremd-DNA erfolgt über die *spacer*, 20 Basen am 5'-Ende der crRNA, welche über einfache Basenpaarung an die Fremd-DNA binden. Daraufhin zerschneidet die Nuklease die Fremd-DNA (Barrangou *et al.*, 2007; Marraffini & Sontheimer, 2008; Garneau *et al.*, 2010; Bhaya *et al.*, 2011). In unterschiedlichen Bakterien und Archaea gibt es verschiedene CRISPR-Systeme (Bhaya *et al.*, 2011). Bei CRISPR-Systemen der Klasse 2 übernimmt ein einziges Protein, wie Cas9, die DNA Spaltung. Cas9 enthält zwei Nuklease-Domänen, die HNH- und die RuvC-Domäne (Abb. 4.1.3B). Jede dieser beiden Domänen schneidet einen der beiden DNA-Stränge (Jinek *et al.*, 2012). Das am weitesten verbreitete CRISPR/Cas9-System, welches für *Genome Editing* genutzt wird, stammt aus *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Für die Erkennung der Ziel-DNA benötigen Cas9-Proteine eine bestimmte Sequenz, das *Proto-spacer Adjacent Motiv* (PAM). Dieses PAM befindet sich am 3'-Ende der Ziel-DNA (Abb. 4.1.3B). Die Sequenz des PAMs ist abhängig von den unterschiedlichen Cas9-Proteinen (Bi & Yang, 2017). Die PAM-Sequenz von SpCas9 ist 5'-NGG-3' oder 5'-NAG-3'. SpCas9 schneidet, nach erfolgreicher DNA-Bindung, die Ziel-DNA 3bp vor dem PAM-Motiv. Dabei entsteht kein Überhang, sondern ein glattes Ende (*blunt-end cut*; Garneau *et al.*, 2010).

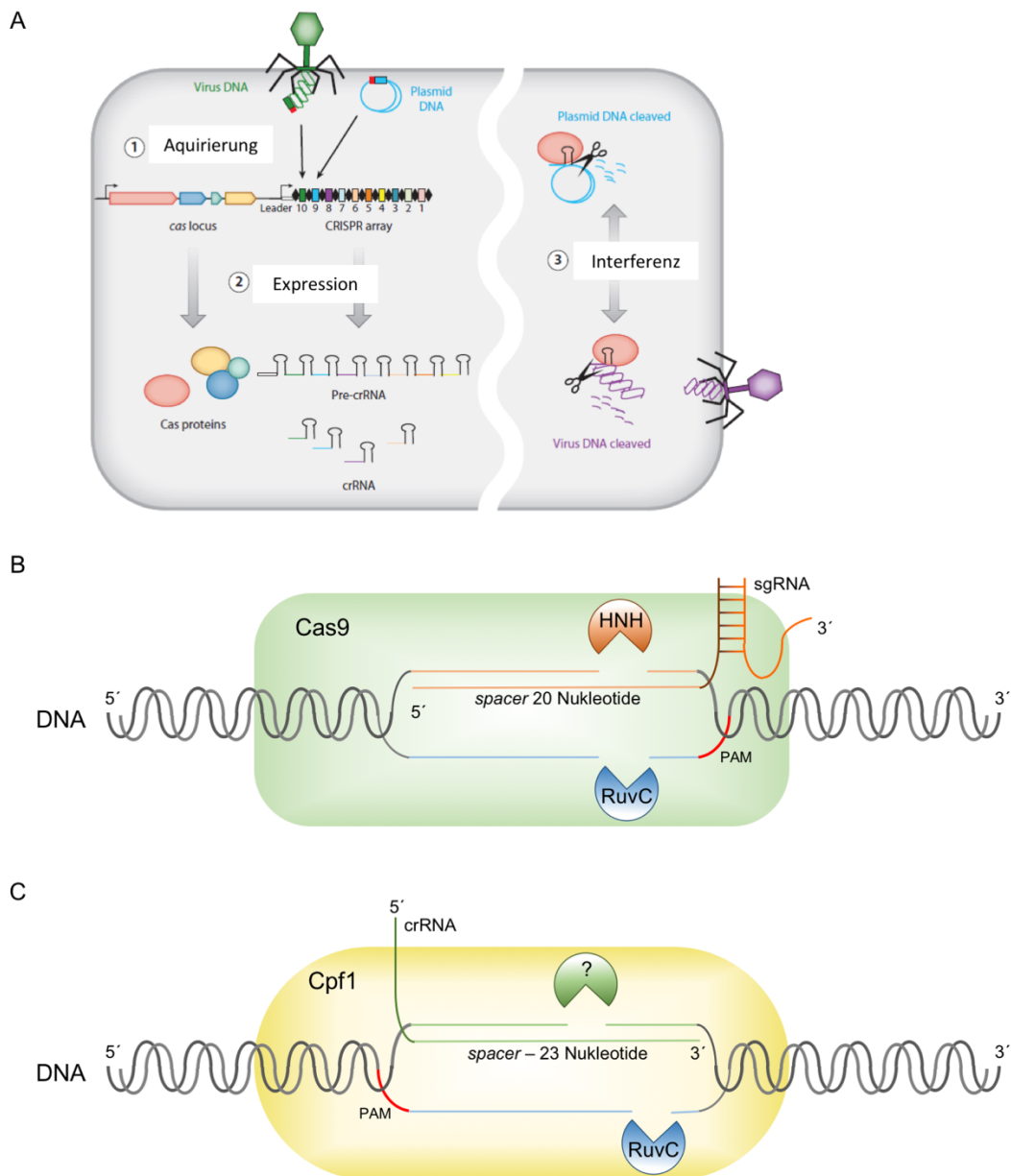


Abbildung 4.1.3 Funktion und Aufbau von CRISPR-Systemen

A) Schematische Darstellung der natürlichen Funktionsweise von CRISPR/Cas-Systemen. Als erstes werden, durch Rekombination, Fremd-DNA-Stücke in den CRISPR-Array akquiriert (1 – Akquirierung). Bei erneutem Eindringen von Fremd-DNA werden die Cas-Protein und der CRISPR-Array exprimiert (2 – Expression). Zunächst wird eine Pre-crRNA transkribiert, die durch Cas- und andere Proteine zu crRNAs prozessiert wird. Als nächstes bilden crRNA und eine Cas-Nuklease einen Komplex. Die crRNA führt die Cas-Nuklease dann zur Ziel-DNA. Nach der DNA-Bindung durch die crRNA wird die Ziel-DNA durch die Nuklease geschnitten (3 – Interferenz). Nun können wieder neue Fremd-DNA-Abschnitte akquiriert werden. Im CRISPR-Array: schwarze Rauten – *direct repeats*; farbige Rechtecke – Fremd-DNA-Abschnitte, *spacer*, Abbildung verändert nach Bhaya *et al.*, 2011 **B)** Aufbau und Funktion von Cas9. Cas9 besitzt zwei Nukleasedomänen. Eine HNH- und eine RuvC-Domäne. Cas9 bindet zuerst an die PAM-Sequenz (NGG) und sucht so nach der Zielsequenz. Kann die sgRNA die Ziel-DNA über den 20 Nucleotide langen *spacer* binden, so kommt es zur Spaltung der DNA. Dabei produziert Cas9 glatte DNA-Enden. **C)** Aufbau und Funktion von Cpf1. Cpf1 besitzt eine RuvC-Nukleasedomäne sowie eine bisher unbekannte zweite Nukleasedomäne. Cpf1 bindet an die PAM-Sequenz (TTTN), im 5'-Bereich der *spacer*-Sequenz. Kann die crRNA die Ziel-DNA über den 23 Nucleotide langen *spacer* binden, so kommt es zur Spaltung der DNA. Dabei produziert Cpf1 zwei 5 Basenpaar große Überhänge. CRISPR – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; Cas-Proteine – CRISPR assoziierte Proteine; sgRNA – single guide RNA; crRNA – CRISPR RNA; Cpf – *CRISPR from Prevotella and Francisella*.

Der entscheidende Durchbruch, um das CRISPR/Cas9-System als *Genome Editing* Werkzeug zu verwenden, kam durch die Arbeiten von Jinek *et al.* 2012 und Cong *et al.*, 2013. Jinek *et al.*, 2012 konnten zeigen, dass Cas9 zusammen mit einer einzelnen *single guide* RNA (sgRNA) DNA *in vitro* und *Escherichia coli* schneiden kann. Die sgRNA ist eine künstliche Fusion der crRNA und der tracrRNA (Jinek *et al.*, 2012). In der Studie von Cong *et al.*, 2013 konnte das erste Mal gezeigt werden, dass es möglich ist, mit CRISPR/Cas9 DNA in eukaryotischen Zellen zu schneiden. Dafür wurden humane Zellen mit Cas9-, tracrRNA- und crRNA-Konstrukten transfiziert und anschließend analysiert (Cong *et al.*, 2013). So konnte festgestellt werden, dass diese drei Komponenten auch in humanen Zellen ausreichen um DSBs in das Genom einzufügen. Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass das CRISPR/Cas9-System in der Lage ist, gleichzeitig zwei DSBs in das humane Genom einzufügen. Auf diese Weise ist es möglich, zwei Loci gleichzeitig zu editieren oder an einem Locus zwei DSBs einzufügen und so eine Deletion einzufügen (Cong *et al.*, 2013).

Kurze Zeit später konnte CRISPR/Cas9 auch in Pflanzen erfolgreich zum *Genome Editing* eingesetzt werden (Li *et al.*, 2013b; Miao *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013). Reispflanzen wurden, neben *Arabidopsis thaliana* (Jiang *et al.*, 2013) und *Nicotiana benthamiana* (Nekrasov *et al.*, 2013), als eine der ersten Pflanzen genutzt, um das Genom mit Hilfe von CRISPR/Cas9 zu editieren (Miao *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013). So ist es nun auch mit dem CRISPR/Cas9-System möglich, das Genom von Reis zu editieren um, ähnlich wie mit dem TALEN-System, resistente Reispflanzen zu erzeugen. Es konnten bereits erfolgreich Mutationen im Promotorbereich der Suszeptibilitätsgene *OsSWEET11* und *OsSWEET14* in Reis-Protoplasten (Jiang *et al.*, 2013) sowie *OsSWEET11*, *OsSWEET14* und *OsSWEET13* in transgenen Reispflanzen eingefügt werden (Zhou *et al.*, 2014). Jedoch wurde nicht getestet, ob diese Pflanzen resistent gegenüber Infektionen mit verschiedenen *Xoo*-Stämmen sind. In der Studie von Zhou *et al.*, 2015 wurden mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems, Mutationen im kodierenden Bereich des *OsSWEET13* Gens eingefügt (Null-Mutanten). Die Autoren konnten zeigen, dass diese Mutationen Resistenzen gegenüber bestimmten *Xoo*-Stämmen vermitteln können (Zhou *et al.*, 2015). Die editierten Pflanzen wurden mit einem *Xoo*-Stamm getestet, welcher einen künstlichen TALE besitzt, der im Promotorbereich von *OsSWEET13* bindet und dieses induziert. In *leaf-clipping*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieser *Xoo*-Stamm keine Virulenzsymptome, auf den *OsSWEET13* Null-Mutanten, ausbilden kann (Zhou *et al.*, 2015). In diesem Beispiel wurde nicht die TALE-Bindestelle im Promotor des Suszeptibilitätsgens mutiert, sondern das Suszeptibilitätsgen selbst. Auf diese Weise ist es ebenfalls möglich, resistente Reispflanzen zu generieren. Jedoch birgt diese

Methode, durch Mutation eines Gens, das Risiko, zelluläre Abläufe während der Entwicklung der Pflanzen zu stören. Dennoch konnten in dieser Studie mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie relativ einfach und schnell resistente Reispflanzen generiert werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen das große Potential der CRISPR/Cas9-Technologie für das *Genome Editing* in Pflanzen. Insbesondere ist es mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie möglich, innerhalb eines Arbeitsschrittes, resistente Reispflanzen zu generieren, welche gegen eine Vielzahl von *Xoo*- oder *Xoc*-Stämmen resistent sind.

4.1.3.2 *Genome Editing* mit Hilfe von CRISPR/Cpf1

Neben dem CRISPR/Cas9-System gibt es ein weiteres RGN-System, welches großes Potential für das *Genome Editing* zeigt. Das CRISPR/Cpf1-System stammt aus den Bakterien *Prevotella* und *Francisella* (Cpf1 – *CRISPR from Prevotella and Francisella 1*). Cpf1 gehört zu den selben Klasse 2 CRISPR-Systemen wie Cas9 (Shmakov *et al.*, 2017). Es hat ähnlich wie Cas9 eine RuvC-, jedoch keine HNH-Nukleasedomäne. Stattdessen vermutet man, dass es eine zweite bisher unbekannte Nukleasedomäne gibt, welche den anderen DNA-Strang spaltet (Yamano *et al.*, 2016; Abb. 4.1.3C). Neben diesem Unterschied gibt es weitere, die die Systeme voneinander abgrenzen. So gibt es im Cpf1-System keine tracrRNA. Das System funktioniert mit einer einzelnen crRNA (Bi & Yang, 2017). Die größten und wichtigsten Unterschiede liegen jedoch in der PAM-Sequenz und dem Spaltungs-Modus. Die PAM-Sequenz des Cpf1-Systems ist 5´-TTTN-3´ und befindet sich am 5´-Ende der *spacer*-Sequenz (Abb. 4.1.3C;). Außerdem schneidet Cpf1, anders als Cas9, die DNA versetzt und produziert so zwei 5bp große Überhänge (*sticky-end cut*; Abb. 4.1.3C; Nishimasu *et al.*, 2014; Zetsche *et al.*, 2015b,a; Dong *et al.*, 2016; Yamano *et al.*, 2016). Daher hat das Cpf1-System unter Umständen spezifische Vorteile gegenüber dem Cas9-System. Zum Beispiel sind die entstehenden Insertions/Deletions-Mutationen (InDels), im Vergleich zum Cas9-System, wesentlich größer (Mahfouz, 2017). Dies könnte auf den Überhang, den Cpf1 erzeugt, zurückgeführt werden. Um durch NHEJ die entstandenen DNA-Enden wieder zu ligieren, muss als erstes der Überhang abgespalten werden. Erst dann können die DNA-Enden ligiert werden. Somit entstehen größere InDel-Mutationen als bei dem Cas9-System. Dies kann bei Mutationen von Genen, regulatorischen Elementen oder TALE-Bindestellen von Vorteil sein. Außerdem sind die entstehenden Überhänge des Cpf1-Systems eventuell besser um DNA-Elemente in ein Ziel-Genom einzubringen.

Wie bei Cas9 gibt es auch bei Cpf1 verschiedene Proteine aus verschiedenen Bakterien. Die meist genutzten Cpf1-Systeme sind FnCpf1 (*Francisella novicida*), AsCpf1

(*Acidaminococcus* spp.) und LbCpf1 (*Lachnospiraceae* bacterium). Die ersten erfolgreichen Tests von Cpf1-Systemen wurden in humanen Zellen (Zetsche *et al.*, 2015a; Kleinstiver *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017), Maus (Hur *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016a), Pflanzen (Ma *et al.*, 2012; Endo *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017) und Cyanobakterien (Ungerer & Pakrasi, 2016) demonstriert. Xu *et al.* konnten zeigen, dass *Genome Editing* in Reis mit dem LbCpf1-System möglich ist. Die Autoren konnten erfolgreich Mutationen in die endogene *OsPDS* und *OsBEL* einfügen (Xu *et al.*, 2017). In der Studie von Tang *et al.* wurden die Systeme AsCpf1 und LbCpf1 in Reis verglichen (Tang *et al.*, 2017). Die Autoren konnten zeigen, dass mit LbCpf1 eine höhere Mutationsrate in Reis-Protoplasten erreicht werden kann als mit AsCpf1. In transgenen Pflanzen konnten teilweise Mutationsraten von 100% erreicht werden, dabei waren die meisten Mutationen biallelisch (Tang *et al.*, 2017). Generell kann festgestellt werden, dass mit dem CRISPR/Cpf1-System, Mutationen mit vergleichbaren oder höheren Frequenzen zum CRISPR/Cas9-System eingefügt werden können. Genauso wie mit CRISPR/Cas9 ist es mit dem CRISPR/Cpf1-System in Pflanzen möglich, mehrere Loci gleichzeitig zu editieren. In der Studie von Wang *et al.* wurden mit FnCpf1 und LbCpf1, jeweils vier Loci (in unterschiedlichen Genfamilien) gleichzeitig editiert (Wang *et al.*, 2017). Dabei konnten Mutationsraten, an allen vier Loci, von 44% (FnCpf1) bzw. 67% (LbCpf1) erreicht werden (Wang *et al.*, 2017). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch das versetzte schneiden von Cpf1, die HDR-Effizienz im Vergleich zu Cas9 höher ist (Begemann *et al.*, 2017). Mit dem FnCpf1-System konnte, für das Einbringen eines DNA-Fragments in das *Chlorophyllide-a-Oxygenase*-Gen von Reis (*CAO1*), eine HDR-Frequenz von 8% erreicht werden (Begemann *et al.*, 2017). Für das CRISPR/Cas9-System wurden in monokotyledonen Pflanzen HDR-Frequenzen von 2-4% berichtet (Svitashev *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Somit gibt die Studie von Begemann *et al.* einen ersten Hinweis darauf, dass das Cpf1-System höhere HDR-Frequenzen erzeugen kann als das Cas9-System (Begemann *et al.*, 2017). Alles in allem hat man mit dem CRISPR/Cpf1-System eine vielversprechende Alternative zum CRISPR/Cas9-System für *Genome Editing* in Pflanzen.

4.2 Konstruktion und Funktionalität von scTALEN

TALEN sind Fusionsproteine aus einem TALE und der *FokI*-Nukleasedomäne. TALEN werden als Paar eingesetzt, wobei zwei Proteine in gegensätzlicher Orientierung an die DNA binden (Carroll, 2014; Malzahn *et al.*, 2017). Zur Vereinfachung der Technologie wurden erfolgreich scTALEN erstellt. Dafür wurde an einen TALE zwei heterodimerisierende *FokI*-Monomere fusioniert.

4.2.1 Aktivität von scTALEN *in vitro*

scTALEN sind TALEN-Proteine, bei denen beide *FokI*-Monomere in einem Protein vorhanden sind. Durch die Nutzung von scTALEN für *Genome Editing* könnte man, im Gegensatz zu herkömmlichen TALEN, einen DSB mit nur einem einzigen Protein einfügen. Somit wäre die Herstellung und Transformation der Proteine einfacher. Des Weiteren wäre es möglich, durch die Kombination von zwei scTALEN, zwei DSBs an zwei unterschiedliche Loci zu induzieren.

Als erstes wurden die neu erstellten scTALEN *in vitro* auf ihre Fähigkeit, DNA zu spalten, getestet. Es konnte gezeigt werden, dass scTALEN in der Lage sind, ebenso wie ein TALEN-Paar, DNA *in vitro* zu spalten (Abb. 3.2.1; Abb. 3.2.2). Um die Effizienz eines TALEN-Paares und einer scTALEN vergleichen zu können, wurde die DNA-Spaltung im Verlauf der Zeit analysiert (Abb. 3.2.2**B/C**). Dabei wurde festgestellt, dass die scTALEN die DNA ein wenig effizienter spaltet als das TALEN-Paar. Jedoch war zu erkennen, dass sowohl bei dem TALEN-Paar als auch bei der scTALEN die eingesetzte DNA auch nach 120min Inkubationszeit nicht vollständig gespalten werden konnte. Um zu analysieren ob die eingesetzte DNA-Menge einen Einfluss auf die Effizienz hat, wurden verschiedene DNA-Konzentrationen getestet und für eine Stunde mit einer scTALEN inkubiert. Auch hier konnten weder 200ng DNA noch 50ng DNA vollständig gespalten werden. Ein möglicher Grund hierfür kann eine zu geringe Menge an eingesetztem Protein sein. Da es schwierig ist TALEN zu reinigen (Reschke, 2012), wurden die TALEN und scTALEN für die *in vitro* Experimente mit Hilfe eines *in vitro* Transkriptions- und Translations-Kits (TnT) exprimiert. Daher ist es schwierig, die eingesetzte Proteinmenge zu bestimmen. Die für die Expression verwendete DNA-Menge und die Menge an TnT-Reaktion, welche für die Experimente eingesetzt wurde, war bei den einzelnen Reaktionen identisch. Jedoch kann es durchaus sein, dass die Proteinmenge an eingesetztem TALEN-Paar und scTALEN in der Zeitreihe unterschiedlich ist. Somit sind die ermittelten Effizienzen nur als Richtwerte zu interpretieren. Daher würde ich schlussfolgern, dass die scTALEN DNA vergleichbar zu dem TALEN-Paar schneiden. Um eine genauere Aussage treffen zu können, müssten die Experimente mit genau bestimmten Proteinmengen wiederholt werden. Bei dem Zeitreihe-Experiment ist außerdem zu erkennen, dass sowohl für das TALEN-Paar als auch für die scTALEN das Maximum an geschnittener DNA nach 105 Minuten vorliegt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation nimmt der prozentuale Anteil an geschnittener DNA wieder ab. So könnte es zum einen sein, dass die TALEN-Proteine ab diesem Zeitpunkt nicht länger stabil sind und somit keine weitere DNA spalten. Um diese Theorie zu testen, wurde die scTALEN Ax7L35 vor der Reaktion bei 37°C oder auf Eis vorbehandelt und anschließend für eine Stunde bei 37°C zusammen mit der Ziel-DNA inkubiert (Abb. 3.2.3A). Dabei ist zu erkennen, dass je länger die Prä-Inkubation war, desto schlechter

war die Effizienz mit der die Ziel-DNA geschnitten wurde. Dies weist darauf hin, dass die Proteine nach ca. zwei Stunden inaktiv werden. Dies allein erklärt jedoch nicht den Rückgang des Anteils an geschnittener DNA in dem Zeitreihe-Experiment. Es erklärt lediglich warum keine weitere DNA geschnitten wurde. Theoretisch sollte aber die Menge an geschnittener DNA zwischen 105 Minuten und 120 Minuten gleichbleiben. Daher könnte es sein, dass die Restriktionsreaktion oder die TnT-Reaktion mit Nukleasen kontaminiert waren. Diese könnten die DNA abgebaut haben. Somit könnte der Rückgang des Anteils an geschnittener DNA erklärt werden. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass auch nach 120 Minuten Inkubationszeit keine vollständige Spaltung der DNA zu erkennen ist. Um zu überprüfen ob eine geringere DNA vollständig gespalten werden kann, wurden unterschiedliche DNA-Konzentrationen (50, 100, 150, 200ng) für eine Stunde mit der scTALEN scAx7L35 inkubiert. Dabei konnte ebenfalls keine vollständige DNA-Spaltung nachgewiesen werden (Abb. 3.2.3B). Auch die kleinste eingesetzte DNA-Menge von 50ng konnte nicht vollständig gespalten werden, sodass ca. 60% der eingesetzten DNA nicht geschnitten wurden. Ein Grund dafür kann eine zu geringe scTALEN-Konzentration sein. Gabsalilow *et al.*, 2013 konnten für das Wildtyp FokI-Protein in einem Restriktionsassay zeigen, dass 0,2nM Protein nicht zu einer vollständigen DNA-Spaltung führen. Bei einer Proteinkonzentration von 0,6nM konnte die lineare Ziel-DNA nach 120 bzw. 180 Minuten nahezu vollständig gespalten werden (Gabsalilow *et al.*, 2013). Daher lässt sich für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Restriktionsassays sagen, dass eine höhere Proteinkonzentration zu einer vollständigeren DNA-Spaltung hätte führen können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass scTALEN erfolgreich erstellt werden konnten und diese *in vitro* DNA spalten können. Dabei ist die Effizienz der scTALEN im Vergleich mit einem herkömmlichen TALEN-Paar vergleichbar oder höher. Somit konnte bis hierher ein personalisiertes Restriktionsenzym erstellt werden, welches relativ einfach zu erstellen und einzusetzen ist. Es wäre denkbar mit Hilfe von scTALEN ein eigenes personalisiertes oder allgemeingültiges Klonierungssystem zu erstellen. Die Voraussetzungen dafür erfüllen die scTALEN. Sie schneiden DNA *in vitro* und erzeugen einen definierten 4bp Überhang (Kapitel 3.2.1, Abb. 3.2.4). Dafür müsste jedoch in einem ersten Schritt getestet werden, ob zwei DNA-Fragmente, welche mit einer scTALEN gespalten wurden, erfolgreich in einen Vektor ligiert werden können. Gelingt dies, wäre es möglich, bestimmte Klonierungen unabhängig von herkömmlichen Restriktionsenzymen zu vollziehen. So könnte man ein DNA-Fragment, welches nicht von kommerziellen Restriktionsenzym-Bindestellen flankiert wird, mit Hilfe von scTALEN in einen Vektor klonieren oder mit anderen Fragmenten kombinieren.

4.2.2 Aktivität von scTALEN *in vivo*

Nachdem die Funktionalität der scTALEN *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurden diese auf ihre Aktivität *in planta* getestet. Dafür wurde zunächst ein GUS-Rekonstitutionsassay in *N. benthamiana* durchgeführt (Abschnitt 3.2.2; Abb. 3.2.5A und B). Bei diesem Experiment konnte nur für das TALEN-Paar Ax7L/Ax7R, nicht aber für die scTALEN Ax7L35 und Ax7R35, Aktivität nachgewiesen werden. Somit sieht es danach aus, dass die scTALEN nicht in der Lage sind, einen DSB in die DNA einzufügen. Um sicherzugehen, dass die scTALEN auch in der Pflanze exprimiert werden, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 3.2.5C/D). Dabei wurden Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen um außerdem zu testen, ab wann Protein von TALEN bzw. scTALEN nachweisbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Nukleasen zwischen 24 und 36 Stunden beginnt. Die Proben für den GUS-Rekonstitutionsassay wurden nach 48 Stunden geerntet. Da die Expression von TALEN erst zwischen 24 und 36 Stunden beginnt, könnte die Inkubationszeit in der Pflanze für zukünftige Experimente mit Nukleasen verlängert werden. Auf diese Weise können vielleicht bessere Ergebnisse erzielt werden, da die Proteine mehr Zeit haben, um die DNA zu schneiden und die Zelle ebenfalls mehr Zeit hat, um die entstandenen DSBs zu reparieren.

Bei der Western-Blot-Analyse wurde für die herkömmliche TALEN Ax7L ein Signal von ca. 135 kDa und für die scTALEN Ax7L35 ein Signal von ca. 150 kDa erwartet. Nur für die TALEN Ax7L konnte ein Signal mit der korrekten Größe nachgewiesen werden (Abb. 3.2.5C). Jedoch sind ebenfalls kleinere Signale zu erkennen, welche auf Abbau des TALEN-Proteins schließen lassen. Bei der scTALEN Ax7L35 kann kein Signal mit der erwarteten Größe von 150 kDa nachgewiesen werden. Es sind ebenfalls nur Signale mit der Größe einer herkömmlichen TALEN zu erkennen. Somit sind keine scTALEN Proteine mit der korrekten Größe nachweisbar. Da ein N-terminaler Epitop-Tag verwendet wurde, ist es wahrscheinlich, dass das zweite *FokI*-Monomer abgespalten wurde. Dies könnte erklären warum keine Aktivität der scTALEN in dem GUS-Rekonstitutionsassay nachgewiesen werden konnte. Es könnte jedoch ebenso sein, dass die scTALEN mit korrekter Größe nicht detektierbar waren. Mit 150 kDa ist die scTALEN sehr groß. Große Proteine lassen sich unter Umständen nur schwer mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse nachweisen. So können große Proteine nur schwer und langsam aus dem Proteingel auf die Membran übertragen werden. Daher könnte die Expression der scTALEN in *N. benthamiana* nochmals getestet werden. Dabei sollte zum einen ein 8%iges Proteingel, Tris-Acetat anstatt Tris-HCL Proben-Puffer und eine längere *Blotting*-Zeit gewählt werden. Um zu überprüfen ob es ein generelles Problem mit dem scTALEN Ax7L35-Konstrukt gibt, wurde die Expression in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten getestet. Dieses Experiment

wurde durch unseren Kooperationspartner Dr. Lennard Eschen-Lippold durchgeführt. In Abb. 4.2.1. ist zu erkennen, dass sowohl die TALEN Ax7L als auch die scTALEN Ax7L35 in *Arabidopsis* Protoplasten exprimiert werden. Dafür wurden die TALEN Ax7L und Ax7L35 in einen speziellen Vektor für die Expression kloniert (pUGW15, Nakagawa *et al.*, 2007). Erwartet wurden in diesem Experiment die TALEN Ax7L mit einer Größe von ca. 105 kDa und die scTALEN Ax7L35 mit einer Größe von ca. 130 kDa. Betrachtet man dieses Ergebnis, so ist es möglich, dass die scTALEN auch in *N. benthamiana* exprimiert werden, die scTALEN Expression jedoch nicht korrekt nachgewiesen werden kann.

4.2.2.1 Kombination von zwei scTALEN

Eine weitere Möglichkeit warum keine Aktivität im GUS-Rekonstitutionsassay nachgewiesen werden konnte ist, dass sich die Mutationen, die durch eine scTALEN eingefügt werden, nicht akkumulieren können, da die scTALEN kontinuierlich binden und die DNA schneiden könnten. Bei einem TALEN-Paar ändert sich durch eine Insertion oder Deletion im Schnittbereich die Größe des *Spacer*-Bereichs. Dadurch können die zwei *FokI*-Domänen nicht mehr dimerisieren und die DNA wird nicht länger gespalten.

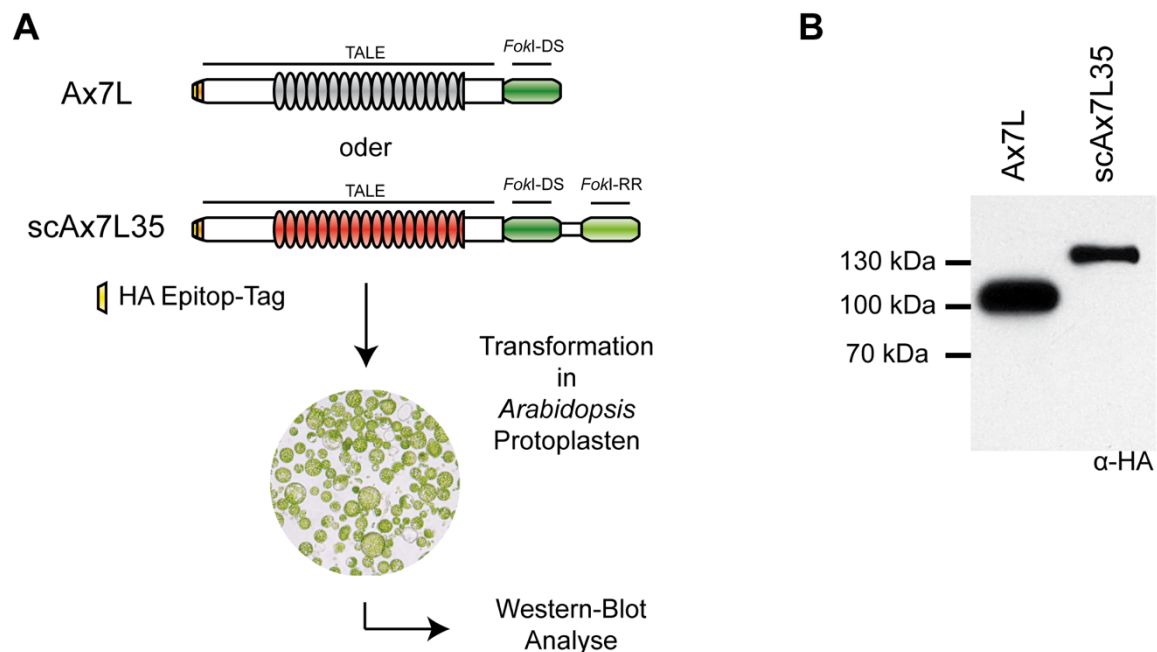


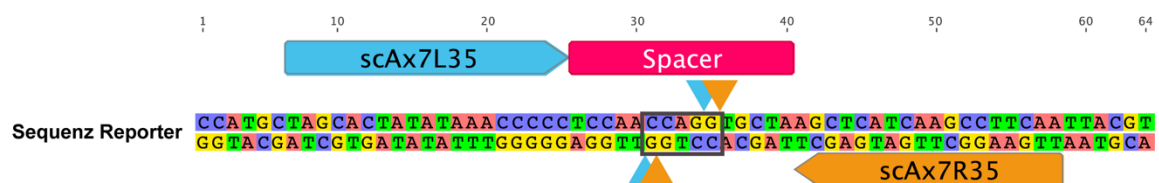
Abbildung 4.2.1 Test der Expression von scTALEN in *Arabidopsis* Protoplasten

A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs. Die TALEN Ax7L und die scTALEN scAx7L35 wurden in den Vektor pUGW15 kloniert. Durch diesen Vektor wird ein 3x HA-Epitop-Tag (gelb) an die Proteine fusioniert. Ax7L oder scAx7L35 wurden getrennt voneinander in *Arabidopsis* Protoplasten transformiert. **B)** Zwei Tage nach der Transformation wurden Proben geerntet und mit Hilfe eines Western-Blots analysiert. Die Detektion der TALEN-Proteine erfolgte mittels eines spezifischen HA-Antikörpers. Die erwartete Größe der TALEN Ax7L beträgt ca. 105 kDa und die erwartete Größe der scTALEN scAx7L35 beträgt ca. 130 kDa.

Um dies zu überprüfen wurden beide scTALEN (Ax7L35 und Ax7R35) zusammen mit dem GUS-*oof*-Reporter in *N. benthamiana* getestet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl

das TALEN-Paar als auch beide scTALEN zusammen in der Lage sind, die GUS-Aktivität des Reporters wiederherzustellen (Abb. 3.2.6F). Dieses Ergebnis zeigt, dass die scTALEN in irgendeiner Art und Weise funktional sein können. Geht man davon aus, dass die scTALEN in der Pflanzenzelle abgebaut werden, wäre eine Erklärung für die GUS-Aktivität, dass die beiden scTALEN als normales TALEN-Paar die DNA spalten und einen DSB einfügen. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, denn wird bei beiden scTALEN das C-terminale *FokI*-Monomer RR abgebaut, so können die beiden scTALEN mit dem verbleibenden *FokI*-Monomer DS nicht dimerisieren (Abb. 3.2.6C). Für diese Theorie spricht, dass bei dem Test der *forward* scTALEN scAx7L35 und der normalen *reverse* TALEN Ax7R keine GUS-Aktivität gemessen werden kann (Abb. 3.2.6D/E). Eine mögliche Erklärung für die Wiederherstellung der GUS-Aktivität von beiden scTALEN zusammen ist, dass beide scTALEN an die DNA binden und diese spalten. Dadurch könnte die Sequenz zwischen den beiden DSBs deletiert werden. Zwischen den Schnittpunkten der beiden scTALEN scAx7L35 und scAx7R35 befinden sich 5bp (Abb 4.2.2A). Werden diese 5bp deletiert, führt dies dazu, dass der Leserahmen des Reportergens wiederhergestellt wird (Abb 4.2.2B).

A Schnittpunkte von beiden scTALEN



B Wiederherstellung des Reportergens

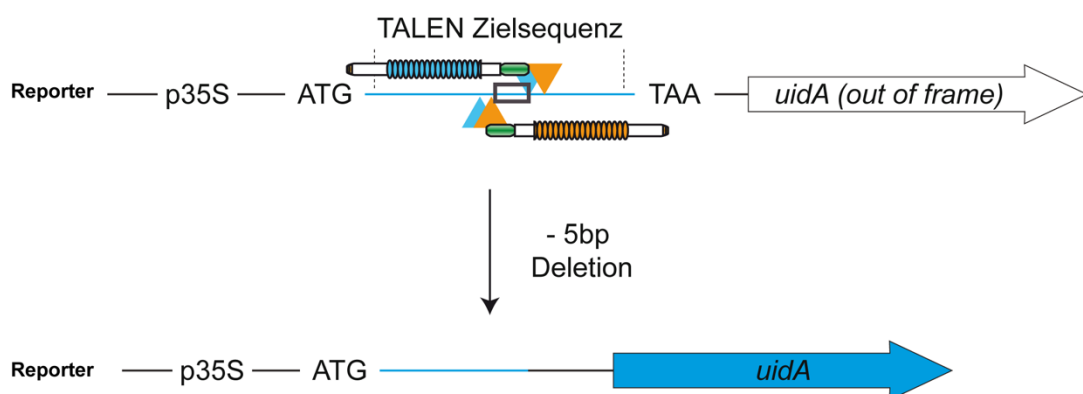


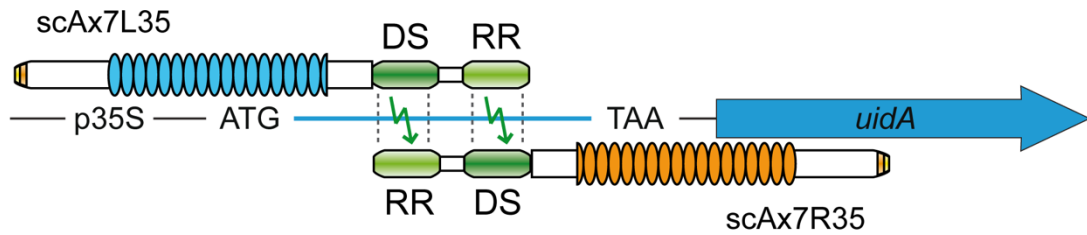
Abbildung 4.2.2 Schematische Darstellung des Ergebnisses von zwei DSBs

A) Ausschnitt aus dem GUS-*oof*-Reporter. Zu sehen sind die Bindestellen der scTALEN scAx7L35 (blau) und scAx7R35 (orange). Weiterhin sind die jeweiligen Schnittpunkte eingezeichnet (blaue oder orange Dreiecke). Die Basen, die durch die zwei eingefügten DSBs potentiell deletiert werden könnten, sind mit schwarz umrahmt. B) Schematische Darstellung der Wiederherstellung der Reporter-gen-Aktivität. Werden die 5bp, welche sich zwischen den DSBs befinden, deletiert, wird der Leserahmen des Reportergens (*uidA*) wiederhergestellt (unten).

Auch in diesem Fall könnten die scTALEN weiter an die DNA binden und sie spalten. Es wäre aber auch denkbar, dass entweder durch den kleiner werdenden Bereich zwischen den scTALEN sich diese bei der DNA-Spaltung gegenseitig behindern oder dass durch mehrere Runden binden und deletieren von ca. 5bp die Bindestellen der scTALEN mutieren. Somit könnten die Mutationen im Promotor-Bereich des Reportergens akkumulieren und es kann Reporter-gen-Aktivität gemessen werden. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Ausbildung eines Doppel-Dimers. Binden beide scTALEN zur selben Zeit an ihre Zielsequenzen, könnte jeweils das *FokI*-Monomer DS mit dem anderen RR-Monomer einen Dimer bilden und somit die DNA an einer oder zwei Stellen spalten (Abb. 4.2.3A). Gegen diese Theorie spricht, dass für eine scTALEN, zusammen mit der jeweils komplementären normalen TALEN, keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden kann (Abb. 3.2.6E). Eine letzte Möglichkeit ist, dass die scTALEN *in vivo* nur einen der beiden DNA-Stränge spalten und einen sogenannten Nick einfügen. Testet man eine scTALEN alleine mit dem Reporter, so führt ein eingefügter Nick nicht zur Reparatur und somit nicht zur Wiederherstellung der GUS-Aktivität. Testet man jedoch beide scTALEN zusammen mit dem Reporter, so wird in beide DNA-Stränge versetzt zueinander ein Nick eingefügt. Diese beiden Nicks können von der Zelle wie ein DSB repariert werden und somit die GUS-Aktivität wiederherstellen. Dieses Phänomen wurde bereits mit dem CRISPR/Cas9 System beschrieben (Ran *et al.*, 2013). In der Studie von Ran *et al.*, 2013 wurde eine der beiden katalytischen Domänen des Cas9 Proteins mutiert. Somit wurde aus der Cas9-Nuklease eine Cas9-Nickase. Um mit Hilfe der Cas9-Nickase Mutationen in ein Genom einzufügen, wurden zwei sgRNAs verwendet, die je ein Cas9-Nickase-Protein an einen der beiden DNA-Stränge rekrutieren (Cas9-Nickase-Paare). So wird in beide DNA-Stränge ein Nick eingefügt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass zwei Nicks mit einem Abstand von ca. 30-50bp mit hoher Effizienz repariert und InDels eingefügt werden können (Ran *et al.*, 2013). Auch in Pflanzen wie Reis kann man mit den Cas9-Nickasen Mutationen im Genom erzeugen (Mikami *et al.*, 2016). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Rate, mit der Mutationen eingefügt werden, mit den Cas9-Nickasen niedriger ist als mit Cas9-Nukleasen (Mikami *et al.*, 2016).

Testet man scTALEN alleine und in Kombination mit normalen TALEN im GUS-Rekonstitutionsassay, sind diese nicht funktional. Kombiniert man jedoch zwei scTALEN, kann nachgewiesen werden, dass die GUS-Aktivität des Reporters wiederhergestellt wird. Aufgrund dieser Tatsache ist es denkbar, dass die getesteten scTALEN *in vivo* als Nickasen fungieren. Das heißt, dass in der scTALEN-Konfiguration nur eines der beiden *FokI*-Monomere die DNA spalten. Somit wird nur ein Strang gespalten und ein Nick eingefügt.

A *FokI*-Doppel-Dimer



B *scFokI* macht DNA Nicks

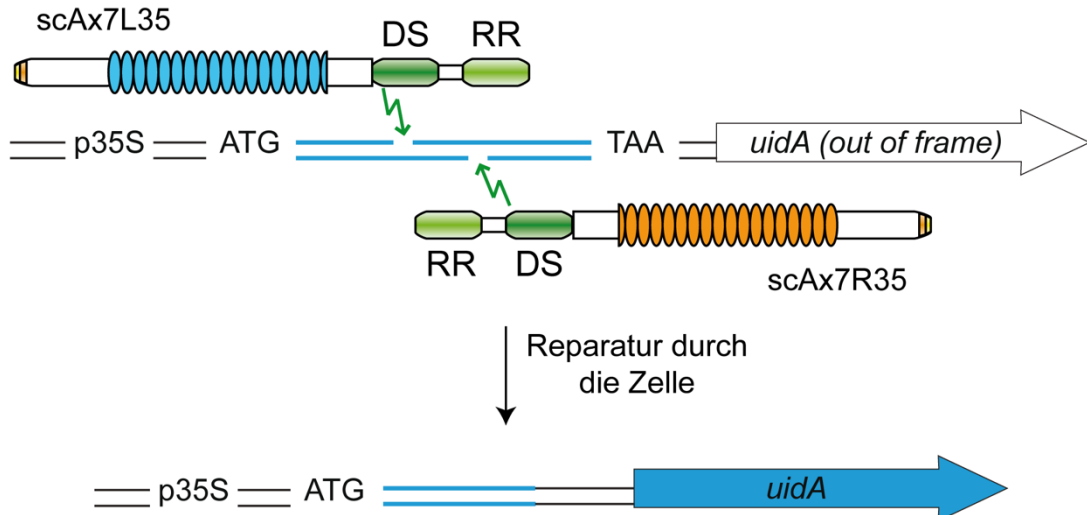


Abbildung 4.2.3 Mögliche Erklärungen der scTALEN Aktivität

A) Schematische Darstellung der scTALEN scAx7L35 und scAx7R35 gebunden an den Promotor-Bereich des GUS-*oof*-Reporters. Eine mögliche Erklärung für die scTALEN Aktivität im GUS-Rekonstitutionsassay könnte die Ausbildung eines Doppel-Dimers sein. Dabei würde das jeweilige *FokI*-Monomer DS mit dem jeweils anderen *FokI*-Monomer RR der anderen scTALEN ein Dimer bilden und die DNA spalten. **B)** Eine weitere Möglichkeit ist, dass die scTALEN *in vivo* nur einen der beiden DNA-Stränge spalten und einen sogenannten Nick einfügen. Werden in beide DNA-Stränge, in gewisser Nähe, Nicks eingefügt, so können diese beiden Nicks von der Zelle wie ein DSB repariert werden. Dies könnte ebenfalls erklären, warum die GUS-Aktivität wiederhergestellt werden kann, wenn beide scTALEN zusammen mit dem Reporter getestet werden.

Eine mögliche Erklärung für die Aktivität von nur einem *FokI*-Monomer in der *single-chain* Konfiguration wurde von Bitinaite *et al.*, 1998 bei Untersuchungen von Wildtyp *FokI* (*wtFokI*) beschrieben. Die katalytische Domäne von *wtFokI* ist normalerweise inaktiv („*sequestered*“). Nach der spezifischen DNA-Bindung wird die katalytische Domäne aktiv und kann mit einer weiteren katalytischen Domäne einen Dimer bilden. Dann schneidet je ein Monomer einen DNA-Strang (Bitinaite *et al.*, 1998). Vielleicht fehlt bei der *single-chain* Konfiguration die Aktivierung des zweiten (C-terminalen) *FokI*-Monomers RR, sodass nur ein Monomer (*FokI*-DS) aktiv wird und nur einen DNA-Strang spaltet. Für die scTALEN-Nickase Theorie spricht ebenfalls, dass mit Hilfe von zwei scTALEN keine genomische Deletion im AFLP-Assay in *N. benthamiana* nachgewiesen werden konnte. Dieser Test sollte jedoch nochmals wiederholt werden. Dabei sollten zwei normale TALEN-Paare und zwei scTALEN-Nickase-Paare getestet werden. Mit den TALEN-Paaren kann somit getestet werden, ob normale funktionale TALEN in diesem Assay eine genomische

Deletion erzeugen können. Mit den scTALEN-Paaren könnte, durch das Einfügen von vier Nicks, ebenfalls der Bereich zwischen den Nicks deletiert werden. Auf diese Weise könnte man indirekt nachweisen, dass scTALEN Nickasen sind. Eine weitere Möglichkeit um zu testen ob die Nickase-Theorie zutrifft, ist ein *in vivo* HDR-Assay, z.B. in pflanzlichen Protoplasten. DNA-Nicks werden nicht durch NHEJ repariert, können aber den HDR-Reparaturmechanismus in Gang setzen. Dafür müsste man scTALEN zusammen mit einem HDR-Template *in vivo* testen. Als HDR-Template könnte ein linearisiertes DNA-Fragment dienen, auf dem sich z.B. ein Reportergen oder zusätzliche Restriktionsschnittstellen befinden. Fügen die scTALEN einen Nick ein, ist es möglich, dass das HDR-Template in das Genom eingebaut wird. Mit Hilfe des Reportergens oder eines RFLP-Assays mit den zusätzlichen Restriktionsschnittstellen ist dann nachweisbar, ob das HDR-Template eingebaut werden konnte. Mutationen durch NHEJ sollten nicht nachweisbar sein.

4.2.3 Aktivität von scFokI-Konstrukten in anderen Systemen

Es gibt zurzeit nur zwei Studien in denen ebenfalls scTALEN bzw. eine scFokI als ZFN getestet und genutzt wurden. Die erste Studie ist von Minczuk *et al.*, 2008. Um mitochondrielle DNA (mtDNA) zu zerschneiden, wurden scZFN hergestellt. Dafür wurden an ein ZFN zwei wtFokI-Monomere fusioniert (Minczuk *et al.*, 2008). Diese Studie fungierte als Vorlage für die in dieser Arbeit erstellten scTALEN. Die erhaltenen *in vitro* Ergebnisse in dieser Arbeit und in der Studie von Minczuk *et al.* stimmen überein. Ein flexibler Linker, zwischen den FokI-Monomeren mit 17 bzw. 18 AS Länge, ist sowohl in dieser als auch in der Arbeit von Minczuk nicht funktionsfähig. Hingegen schneiden die Varianten mit einem Linker von 30 AS und 35 AS Länge die DNA (Minczuk *et al.*, 2008). Anders als bei den Experimenten in dieser Arbeit, konnten Minczuk *et al.* für die getestete scZFN Aktivität *in vivo* nachweisen. Die scZFN wurden in humanen Zellen getestet und dafür verwendet, eine Population von mutierter mtDNA zu schneiden. Mit Hilfe der scZFN konnten die Autoren die Wildtyp mtDNA in den Zellen anreichern. Die scZFN konnten die mutierte mtDNA viel effizienter schneiden als ein ZFN Monomer (Minczuk *et al.*, 2008).

Die zweite Studie, die bisher veröffentlicht wurde, ist von Sun *et al.*, 2014 und beschreibt scTALENs. Die Autoren erstellten scTALENs um die Konstruktion und Applikation von TALENs zu vereinfachen. Dafür fusionierten sie, vergleichbar zu dieser Arbeit, zwei FokI-Monomere an einen TALE (Sun & Zhao, 2014). Im Gegensatz zu dieser Arbeit nutzten Sun *et al.* FokI-Wiltyp Monomere und einen anderen flexiblen Linker. Mit Hilfe einer scTALEN Bibliothek mit verschiedenen flexiblen Linkern und eines *high-throughput screenings* in Hefezellen, identifizierten die Autoren eine scTALEN Architektur, welche ein GFP-Gen wiederherstellen konnte (Sun & Zhao, 2014). Der flexible Linker besteht aus 95

AS mit einem GSGSGSGS-Motiv am N- und C-terminalen Ende des Linkers. Betrachtet man die Komposition des Linkers, lässt sich erkennen, dass vor allem der Anteil an nicht polaren Aminosäuren, wie z.B. Isoleucin oder Valin, erhöht ist. Die scTALEN mit dem 95 AS Linker wurde dann im Vergleich zu einem TALEN Monomer und einem TALEN Paar in Hefe und in humanen Zellen getestet (Sun & Zhao, 2014). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die scTALEN die DNA eventuell schneiden, dabei jedoch mit deutlich geringerer Effektivität im Vergleich zu einem herkömmlichen TALEN Paar. So fügten die TALEN Paare IndDels in die humanen Gene *ALB1* und *ERCC2* mit einer Effektivität von ca. 25% und 55% ein. Die korrespondierenden scTALEN fügten hingegen IndDels nur mit einer Effektivität von ca. 5% (*ALB1*) bzw. 20% (*ERCC2*) ein (Sun & Zhao, 2014). Dabei sind in den, von den Autoren gezeigten, Agarosegelen der SURVEYOR Assays kaum Signale für die scTALEN erkennbar (Sun & Zhao, 2014; Abb. 4A). Somit konnten die Autoren zeigen, dass es möglich ist, scTALEN zu konstruieren, jedoch ist die Aktivität *in vivo* sehr gering. Jedoch konnten die Studien von Minczuk *et al.* und Sun *et al.* zeigen, dass scFokI-Konstrukte, fusioniert an ZFP oder TALEs, *in vivo* funktional sein könnten (Minczuk *et al.*, 2008; Sun & Zhao, 2014). Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

4.2.4 Alternative Systeme zu scTALEN für *Genome Editing*

Das TALEN-System ist ein mächtiges Werkzeug um DNA in Genomen von eukaryotischen Zellen zu editieren. Wie jedes System hat auch das TALEN-System seine Vor- und Nachteile. Der wohl größte Nachteil des TALEN-Systems ist, dass immer zwei Proteine benötigt werden, da die *FokI*-Domänen nur als Dimer funktional sind. Auch wenn die Nutzung eines Dimer-Systems, im Hinblick auf fehlerhafte DNA-Spaltungen (*off targets*), Vorteile bietet, so kann es unter Umständen schwierig sein, zwei geeignete Zielsequenzen zu finden oder zwei Proteine in die Zielzellen zu transformieren. Ein Ziel dieser Arbeit war es, das TALEN-System durch die Erstellung von scTALEN zu vereinfachen. Damit sollte das Zwei-Protein-System zu einem Ein-Protein-System vereinfacht werden. Auf diese Weise bräuchte man nur eine TALEN-Bindestelle an dem Ziel-Locus finden, nur ein scTALEN-Protein klonieren und ein Protein in die Zielzelle transformieren. Somit wäre es auch möglich, mit 2-4 Proteinen mehrere DSBs gleichzeitig in das Zielgenom einzufügen. In dieser Arbeit konnten erfolgreich scTALEN-Proteine erstellt werden, welche die DNA *in vitro* schneiden. Eine Aktivität *in vivo* konnte jedoch nicht gezeigt werden. Somit konnte das TALEN-System für eine Anwendung *in vivo* nicht auf ein Ein-Protein-System vereinfacht werden.

Im Laufe dieser Arbeit wurden andere *Genome Editing* Systeme entwickelt, die RGN-Systeme (siehe Kapitel 4.1.3), welche es möglich machen weniger zu klonieren, nur ein

Protein in die Zielzelle zu transformieren und gleichzeitig mehrere DSBs in ein Genom einzufügen (Li *et al.*, 2013b; Cong *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015; Malzahn *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Bi & Yang, 2017; Tang *et al.*, 2017). Jedoch haben auch diese neuen Systeme ihre Vor- und Nachteile. Im Folgenden werden die Charakteristika der Systeme kurz verglichen (Tab. 4.2.4.1). Zur Anpassung der Systeme auf das jeweilige Ziel, müssen bei dem TALEN-System zwei TALEN-Proteine kloniert werden, die Proteine bei den CRISPR/Cas9- und CRISPR/Cpf1-Systemen sind universell einsetzbar. Bei diesen Systemen müssen entweder sgRNA bzw. crRNA Konstrukte kloniert oder bestellt werden. Je nachdem was für ein System man nutzt und ob man Multiplex *Genome Editing* machen möchte, ist die Klonierung der sgRNA bzw. crRNA in einem einzigen Schritt möglich. Bei der Erstellung von Multiplex *Genome Editing*-RNA-Konstrukten ist in den meisten Fällen ein zweiter Schritt notwendig (Kim *et al.*, 2016b; Ordon *et al.*, 2016). Zur Klonierung von TALEN-Proteinen ist, aufgrund der repetitiven Natur der *repeats*, ein Zwei-Schritt-Prozess notwendig (Weber *et al.*, 2011; Geißler *et al.*, 2011; Sanjana *et al.*, 2012). Sieht man es aus einem praktischen Blickwinkel, so ist es möglich, sowohl ein sgRNA/crRNA-Konstrukt (Ein-Schritt-Prozess) als auch zwei TALEN-Protein innerhalb von fünf Arbeitstagen fertigzustellen (Tab. 4.2.4.2). Der Vorteil der TALEN-Klonierung liegt darin, dass man in den meisten Systemen nicht darauf angewiesen ist Oligonucleotide zu bestellen. Man greift für die Klonierung auf eine Bibliothek aus einzel-*repeats* zurück (Cermak *et al.*, 2011; Geißler *et al.*, 2011; Sanjana *et al.*, 2012). Dadurch kann man TALEN- und CRISPR-Konstrukte in der gleichen Zeit fertigstellen. Bei der Erstellung der CRISPR-Konstrukte benötigt man jedoch weniger Arbeitszeit.

Weitere Unterschiede der TALEN-, CRISPR/Cas9- und CRISPR/Cpf1-Systeme liegen in ihrer Art die DNA zu binden und zu spalten. TALEN binden die DNA über die RVDs der einzelnen *repeats* (Boch *et al.*, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009; Deng *et al.*, 2012a; Mak *et al.*, 2012). Die Systeme CRISPR/Cas9 und CRISPR/Cpf1 binden die DNA mit Hilfe einer RNA über einfache Basenpaarungen (Bhaya *et al.*, 2011; Jinek *et al.*, 2012; Yamano *et al.*, 2016; Bi & Yang, 2017). Dabei hat jedes System seine spezifischen Anforderungen. TALEN benötigen vor der Erkennungssequenz ein initiales Thymin (5'-T). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch gezielte Mutationen im N-terminalen Bereich eines TALEs auch alle anderen Basen vor der Erkennungssequenz toleriert werden können (Lamb *et al.*, 2013). Die RGN-Proteine Cas9 und Cpf1 benötigen für die Bindung der DNA eine spezifische PAM-Sequenz (Cong *et al.*, 2013; Yamano *et al.*, 2016; Bi & Yang, 2017). Diese Sequenz ist bei Cas9 vom jeweiligen Protein abhängig. Die PAM-Sequenz von SpCas9 befindet sich am 3'-Ende der Erkennungssequenz und ist NGG bzw. NAG (Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013; Nishimasu *et al.*, 2014; Doudna & Charpentier, 2014)

	TALEN	CRISPR/Cas9	CRISPR/Cpf1
Generell			
Komponenten	TALE + <i>FokI</i> -Domäne	Cas9-Nuklease + sgRNA oder crRNA + tracrRNA	Cpf1-Nuklease + crRNA
Funktionale Einheit	Protein-Dimer	Protein-Monomer	Protein-Monomer
Katalytische Domäne	katalytische Domäne von <i>FokI</i>	RuvC + HNH	RuvC + ?
Protein-Klonierung	nötig	nicht zwingend nötig	nicht zwingend nötig
RNA-Klonierung bzw. Produktion	nicht nötig	nötig	nötig
DNA-Bindung			
Fixe Positionen	initiales 5'-T	3'-PAM NGG bzw. NAG	5'-PAM TTTN
Länge der Zielsequenz (bp)	variabel 24 - 60	17 - 22	23
<i>off targets</i>	kaum <i>off targets</i>	teilweise viele <i>off targets</i>	kaum <i>off targets</i>
Epigenetik	N* für methyliertes C	kein Problem einfach Basenpaarung	kein Problem einfach Basenpaarung
DNA-Spaltung			
Schnittpunkt	5bp + 9bp nach <i>forward</i> TALEN- Bindestelle	3bp vor PAM-Sequenz	18bp + 23bp nach PAM-Sequenz
Spaltungsform	<i>sticky end</i> 4bp Überhänge	<i>blunt end</i>	<i>sticky end</i> 5bp Überhänge

Tabelle 4.2.4.1 Vergleich der TALEN-, CRISPR/Cas9- und CRISPR/Cpf1-Systeme

Die PAM-Sequenz der Cpf1-Proteine AsCpf1, FnCpf1 und LbCpf1 befindet sich am 5'-Ende der Erkennungssequenz und ist TTTN (Dong *et al.*, 2016; Yamano *et al.*, 2016; Bi & Yang, 2017). Somit haben, anders als bei Cas9, diese drei Cpf1-Proteine aus unterschiedlichen Bakterien-Spezies dieselbe PAM-Sequenz (Świat *et al.*, 2017). Diese PAM-Sequenzen sind aber invariant. Veränderungen führen schnell zum Verlust der Aktivität der Cas9 bzw. Cpf1-Proteine (Cong *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Yamano *et al.*, 2016; Bi & Yang, 2017; Thurtle-Schmidt & Lo, 2018).

Die Länge der Zielsequenzen ist zwischen den einzelnen Systemen ebenfalls unterschiedlich. Bei TALEN werden zwei Zielsequenzen benötigt. Die Länge kann dabei, je nachdem wie viele *repeats* die erstellten TALEN besitzen, von 12bp – 30bp pro TALEN-Bindestelle variieren. Damit kommt man bei beiden TALEN-Proteinen zusammen auf eine Länge der Zielsequenz von 24bp – 60bp. In den meisten Fällen werden TALEN-Proteine mit 17,5 *repeats* genutzt.

System	TALEN	CRISPR/Cas9 und CRISPR/Cpf1
Tag		
1	Festlegen der Zielsequenzen <i>Cut/Lig</i> -Reaktion der Zwischenvektoren (LA-AB-BR) ¹ Transformation in <i>E. coli</i>	Festlegen der Zielsequenz Bestellen der Oligonucleotide ²
2	Animpfen von ÜNK	Warten auf Oligonucleotide
3	MP + KV -> richtige Klone sequenzieren <i>Cut/Lig</i> -Reaktion finale TALEN-Konstrukte Transformation in <i>E. coli</i>	<i>annealing</i> der Oligonucleotide <i>Cut/Lig</i> -Reaktion in Vektor Transformation in <i>E. coli</i>
4	Animpfen von ÜNK Kontrolle der Sequenzen von Tag 3	Animpfen von ÜNK
5	MP + KV der finalen TALEN-Konstrukte Fertig!	MP + KV der finalen CRISPR-Konstrukte richtige Klone sequenzieren Fertig! <i>Cut/Lig</i> -Reaktion in finalen Vektor Transformation in <i>E. coli</i>
6		Kontrolle der Sequenzen von Tag 5 Animpfen von ÜNK
7		MP + KV der finalen Multiplex-CRISPR-Konstrukte Fertig!
8		

Tabelle 4.2.4.2 Ablauf und Dauer der Klonierung von TALEN-, CRISPR/Cas9- bzw. CRISPR/Cpf1-Konstrukten. 1 – *Golden-TAL-Technology* nach Geißler *et al.*, 2011; 2 – CRISPR/Cas9-System nach Ordon *et al.*, 2016. LA-AB-BR – Klonierungsvektoren der *Golden-TAL-Technology*; ÜNK – Übernachtskultur von *E. coli*; MP – Minipräparation von DNA aus *E. coli*; KV – Kontrollverdau der klonierten Plasmide; *Cut/Lig* – *cut-ligation*-Reaktion wobei das Schneiden und Zusammenkleben der DNA gleichzeitig abläuft; *E. coli* – *Escherichia coli*.

Somit hat man eine Zielsequenz von 38bp. Durch diese relativ langen Zielsequenzen ist das TALEN-System sehr spezifisch. Daher treten nur in wenigen Fällen sogenannte *off targets*, DNA-Spaltungen an ungewünschten Loci, auf. In humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass TALENs, welche das CC-Chemokin-Rezeptor-5A-Gen mutieren, eine Mutationsfrequenz des Zielgens von 47% und eine *off-target*-Rate von lediglich 2,3% aufweisen (Guilinger *et al.*, 2014). Bei dem CRISPR/Cas9-System ist die Länge der Zielsequenz durch die Länge des *spacers* definiert und beträgt 20bp. Durch diese relativ kurze Zielsequenz und eine gewisse Toleranz gegen Basen-Fehlpaarungen kann es sein, dass es relativ häufig *off targets* gibt (Pattanayak *et al.*, 2013; Stella & Montoya, 2016). Durch verschiedene Ansätze kann man die *off targets* des CRISPR/Cas9-Systems reduzieren. Zum Beispiel kann man die Anzahl der *off targets* durch die Verkürzung des *spacers* auf bis zu 17bp (Fu *et al.*, 2014) oder durch den Einsatz von Nickase-Paaren (siehe Kapitel 4.2.2.1; Ran *et al.*, 2013) verringern. Bei dem noch recht jungen CRISPR/Cpf1-System beträgt die Länge des *spacers* und somit der Zielsequenz 23bp. Trotz dieser relativ kurzen Zielsequenz wurden in den bisherigen Studien kaum *off targets* gefunden (Hur *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016a; Kleinstiver *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017). Somit scheint das CRISPR/Cpf1-System sehr spezifisch zu sein. Ein weiterer Unterschied

der Systeme liegt im Modus der DNA-Spaltung. TALEN spalten die DNA, aufgrund der katalytischen Domäne von *FokI*, versetzt und produzieren so einen 4bp Überhang (siehe Kapitel 3.2.1; Vanamee *et al.*, 2001). Die Cas9-Nuklease schneidet die DNA nicht versetzt und erzeugt so glatte DNA-Enden (Garneau *et al.*, 2010; Bi & Yang, 2017). Die Nuklease Cpf1 schneidet die DNA ebenfalls versetzt. Dabei entsteht ein 5bp großer Überhang (Dong *et al.*, 2016; Yamano *et al.*, 2016; Bi & Yang, 2017). Durch die Erzeugung von DNA-Überhängen, der TALEN- und CRISPR/Cpf1-Systeme, kann die HDR-Effizienz erhöht werden (Budhagatapalli *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Begemann *et al.*, 2017).

Alles in allem hat jedes dieser *Genome Editing*-Systeme seine Vorzüge. Das TALEN-System produziert DNA-Überhänge und ist hoch spezifisch. Allerdings kann die Erstellung von TALEN-Konstrukten für Unerfahrene schwierig sein. Bei dem CRISPR/Cas9-System ist es extrem leicht Konstrukte zu erstellen. Jedoch kann es zu hohen *off target*-Raten kommen. Zurzeit sieht es danach aus, dass das CRISPR/Cpf1-System die besten Dinge des TALEN- und CRISPR/Cas9-Systems in sich vereint. Konstrukte sind einfach zu erstellen, es produziert DNA-Überhänge und es ist hoch spezifisch. Das CRISPR/Cpf1-System ist das jüngste hier betrachtete System. Daher müssen ein paar Dinge wie *off target*-Raten oder Mutationseffizienzen noch genauer experimentell untersucht werden. Mit diesen drei *Genome Editing*-Systemen ist man nun in der Lage, je nach Anwendung das passende Werkzeug aus seinem Koffer zu holen und anzuwenden. Alle diese Systeme haben hohes Potential dabei zu helfen, in der Zukunft die Forschung in allen Bereichen einen großen Schritt voranzubringen.

4.3 Suche und Identifizierung neuer Ziel-Gene von *Xoo* TALEs

Xoo- und *Xoc*-Stämme besitzen bis über 20 verschiedene TALEs pro Stamm. Die pflanzlichen Zielgene sind jedoch nur für wenige dieser TALEs bekannt und untersucht. Die wichtigsten und bestuntersuchteten Zielgene sind die Gene der *OsSWEET*-Genfamilie. TALEs, welche ein Gen der *OsSWEET*-Genfamilie induzieren, gehören zu den Schlüssel-Virulenzfaktoren von *Xoo* (Yang *et al.*, 2006; Antony *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Streubel *et al.*, 2013; Boch *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015). Weitere bekannte Zielgene sind z.B. *OsTFX1*, *OsHen1*, *OsTFIIAγ1* (Sugio *et al.*, 2007; AS Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2008; Moscou & Bogdanove, 2009; Boch *et al.*, 2014). Die Induktion dieser Gene hat jedoch nur einen geringeren Effekt auf die Virulenz von *Xoo*. Somit stellt sich die Frage, wozu *Xoo* solch eine Vielzahl von TALEs besitzt. Die meisten TALEs könnten ein evolutionäres Überbleibsel und somit ein Reservoir für Neurekombinationen. Sie könnten aber auch eine Rolle bei der Aktivierung von Genen in bisher noch nicht untersuchten *Xoo*-Reis-Interaktionen spielen. Vielleicht sind viele TALEs auch eine Art Sicherheitskopie und führen zu denselben Effekten in der Pflanze. Eine Deletion eines TALEs hätte somit

keinen großen Effekt auf die Virulenz des *Xoo*-Stammes. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die TALE-abhängige Induktion einer Kombination verschiedener Gene zu einem Effekt führt, welcher vorteilhaft für *Xoo* ist. Um diese Theorien überprüfen zu können, müssen zunächst alle in einem *Xoo*-Stamm befindlichen TALEs und deren Zielgene identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden dafür vier verschiedene *Xoo*-Stämme mit Hilfe der SMRT-Sequenzierung sequenziert. Die Sequenzen von drei dieser Stämme konnten, durch unseren Kooperationspartner Dr. Jan Grau, erfolgreich analysiert und die TALE-Gene identifiziert werden. Des Weiteren wurden mittels RNA-seq-Analyse potentielle Zielgene für 16 TALEs identifiziert, für die bisher noch keine Zielgene bekannt sind.

4.3.1 Analyse von *Xoo*-Genomen

Bis vor wenigen Jahren war es äußerst schwierig und aufwändig Bakterien-Stämme der Gattung *Xanthomonas* zu sequenzieren. Dies lag an den speziellen Effektorproteinen, den TALEs. Aufgrund ihrer Größe und repetitiven Struktur ist es mit herkömmlichen Sequenzierungsmethoden sehr schwierig und komplex, ein komplettes TALE-Gen bzw. ein Genom mit mehreren TALE-Genen zu sequenzieren. Das größte Problem dabei ist, die verschiedenen Sequenz-*reads* richtig miteinander zu kombinieren. Durch die Repetitivität der TALE-Gene ist es nur sehr schwer möglich, die einzelnen *reads* den passenden TALE-Genen und Loci im Genom zuzuordnen. Durch eine neue Sequenzierungsmethode, der SMRT-Sequenzierung, ist es nun möglich, sehr lange Sequenz-*reads* zu bekommen (Booher *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2016; Grau *et al.*, 2016). Diese können die Sequenz eines kompletten TALE-Gens inklusive umliegender Gene enthalten. Dadurch wird es einfacher, die verschiedenen Sequenz-*reads* richtig zusammenzufügen. Der Nachteil dieser langen *reads* ist, dass man eine relativ hohe Fehlerquote innerhalb der Sequenz-*reads* hat. Durch eine hohe Abdeckung (*Coverage*) des Genoms mit Sequenz-*reads*, kann man jedoch diese Fehler herausfiltern. Dabei wird sozusagen jede Base in unterschiedlichen *reads* mehrfach sequenziert. Hat man ausreichend *reads*, kann man die jeweils richtige DNA-Base ermitteln und die richtige Sequenz zusammenfügen. Diese neue Methode macht es nun möglich, relativ einfach *Xoo*-Genome mit mehreren TALE-Genen zu sequenzieren. Neben den vier in dieser Arbeit sequenzierten *Xoo*-Stämmen, wurden durch andere Arbeitsgruppen weitere *Xoo*- und *Xoc*-Stämme sequenziert (Wilkins *et al.*, 2015; Booher *et al.*, 2015; Quibod *et al.*, 2016). Quibod *et al.* sequenzierten auf diese Weise neun weitere *Xoo*-Stämme von den Philippinen (Quibod *et al.*, 2016). Somit hat man mit der SMRT-Sequenzierung ein mächtiges Werkzeug um komplexe und repetitive Genome, wie *Xoo*- oder *Xoc*-Genome, zu sequenzieren. Durch Verbesserungen bei der Sequenz-*read* Abdeckung und der

Analyse-Software, wird es zunehmend noch einfacher und günstiger Bakterien-Genome mit der SMRT-Technologie zu sequenzieren.

Die Sequenz der *Xoo*-Stämme zu bekommen, ist für die Analyse der *Xoo*-Stämme jedoch nur der erste Schritt. Um die *Xoo*-Stämme im Hinblick auf ihr TALE-Repertoire analysieren und vergleichen zu können, müssen als nächstes die *TALE*-Gene identifiziert und analysiert werden. Dies kann, in einem Genom mit bis zu 20 *TALE*-Genen, „per Hand“ sehr mühsam sein. Um diesen Prozess zu verbessern, wurde durch unseren Kooperationspartner Dr. Jan Grau die Software AnnoTALE entwickelt (Grau *et al.*, 2016). Mit Hilfe von AnnoTALE ist es für jeden sehr einfach möglich, in einem Genom *TALE*-Gene zu annotieren, zu analysieren und zu gruppieren. Außerdem ist es mit AnnoTALE möglich, TALEs aufgrund ihrer RVD-Sequenz in Klassen einzuteilen und somit einheitliche Namen zu geben (Grau *et al.*, 2016). Diese Klassifizierung und Nomenklatur macht es erstmals möglich, die *TALE*-Repertoires von verschiedenen *Xoo*- und *Xoc*-Stämmen schnell und einfach vergleichen zu können (Grau *et al.*, 2016). Identifiziert man die Ziele der TALEs, kann dann durch die Analyse der *TALE*-Repertoires verglichen werden, welcher Stamm welche Gene induziert. Durch die Klassifikation von TALEs und die Definition von spezifischen *TALE*-Clustern in *Xoo*-Genomen, können nun nicht nur *TALE*-Repertoires an sich, sondern auch die *TALE*-Klassen untereinander und die Verteilung der TALEs innerhalb des Genoms schnell und einfach verglichen werden. Auf Grundlage dieser Informationen ist es nun ebenfalls möglich, der Evolution einzelner TALEs auf den Grund zu gehen. Somit ist es möglich, die TALEs einzelner *TALE*-Klassen untereinander zum Beispiel auf Sequenz-Ebene zu vergleichen. Auf diese Weise kann man Rückschlüsse ziehen, wie Unterschiede in der RVD-Sequenz von TALEs innerhalb einer Klasse entstanden sind (Erkes *et al.*, 2017).

Betrachtet man zum Beispiel die DNA-Sequenz rund um die RVDs herum, kann festgestellt werden, dass diese Sequenzbereiche Informationen über den RVD-Typ (HD, NI, NN, NG usw.) beinhalten. Das heißt, dass die umliegenden Sequenzbereiche spezifisch für einen RVD-Typ sind. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass Rekombination von *TALE repeats* der Hauptmechanismus der *TALE* Evolution ist (Erkes *et al.*, 2017).

Vergleicht man die TALEs eines *TALE*-Clusters verschiedener Stämme so fällt auf, dass die Anzahl und Art der TALEs in einem *TALE*-Cluster variieren kann. Beispielsweise findet man in dem *TALE*-Cluster II von PXO99 zwei (TalBX1 und TalAG1), in KACC10331 drei (TalAC2, TalAS2, TalAG3) und in MAFF311018 vier (TalAC1, TalAS1, TalAG2 und TalBZ1) TALEs (Grau *et al.*, 2016; Abb. 3.3.3.5). Vergleicht man die RVD- und DNA-Sequenzen dieser TALEs miteinander kann festgestellt werden, dass TalAS2 von KACC10331 eine Fusion der TALEs TalAC1 und TalAS1 von MAFF311018 sein könnte (Abb. 4.3.1). Man kann erkennen, dass die ersten acht *repeats* identisch zu denen von

TalAC1 und die letzten 26 *repeats* identisch zu denen von TalAS1 sind (Abb. 4.3.1A). Betrachtet man die DNA-Sequenzen der N- und C-terminalen Bereiche lässt sich erkennen, dass auch der N-terminale Bereich von TalAS2 eine hohe Homologie zum N-terminalen Bereich von TalAC1 aufweist. Somit könnte zwischen den TALEs TalAC1 und TalAS1 ein Rekombinationsereignis aufgetreten sein wodurch die Fusion von TalAC1 und TalAS1 zu TalAS2 erfolgte (Erkes *et al.*, 2017). Ein weiteres Beispiel im Cluster II sind die TALEs TalAG1 von PXO99 und der TalAS2 von KACC10331. Diese beiden TALEs teilen sich jeweils die letzten vier *repeats* sowie den C-terminalen Bereich (NG-N*-NS-N*; Erkes *et al.*, 2017; Abb. 4.3.1B). Somit könnte es durch eine Rekombination im Cluster II von KACC10331 zu dem TALE TalAG1 von PXO99 gekommen sein. Daher ist es theoretisch möglich, dass das ursprüngliche Cluster II von MAFF311018 mit den TALEs TalAC1, TalAS1, TalAG2 und TalBZ1 stammt. Durch Rekombinationen ist dann das Cluster II von KACC10331 und danach das von PXO99 entstanden. Dies zeigt eine Möglichkeit, wie sich TALEs und TALE-Cluster in verschiedenen *Xoo*-Stämmen entwickeln und verändern können.

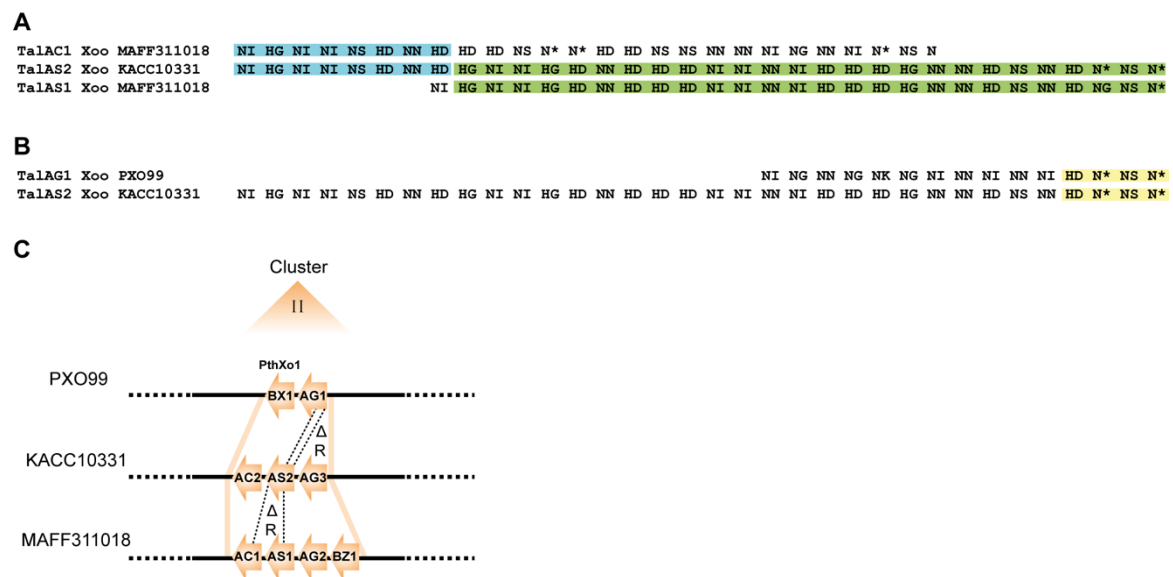


Abbildung 4.3.1 Evolution von TALEs des Clusters II. **A)** Vergleich der RVD-Sequenzen von TalAC1 und TalAS1 von MAFF311018 und TalAS2 von KACC10331. Die ersten acht RVDs von TalAC1 stimmen mit den ersten acht RVDs von TalAS2 überein (blau hinterlegt). Die restlichen RVDs von TalAS2 stimmen mit kürzeren Vertretern der Klasse TalAS, wie TalAS1 überein (grün hinterlegt). **B)** Vergleich der RVD-Sequenzen von TalAG1 von PXO99 und TalAS2 von KACC10331. Die letzten vier RVDs stimmen bei diesen beiden TALEs und einem Teil anderer TALEs der Klasse AS überein (gelb hinterlegt). **C)** Ausschnitt des TALE Clusters II der Stämme PXO99, KACC10331 und MAFF311018. Die Deletions- und Rekombinationsereignisse (Δ R) sind mit gestrichelten Linien dargestellt.

4.3.2 Identifikation neuer TALE Zielgene

Die Identifikation der Zielgene der verschiedenen TALEs ist wichtig um verstehen zu können, wie die einzelnen TALEs die Virulenz und die Infektion von *Xoo*-Stämmen beeinflussen. Mit diesem Wissen ist es dann möglich, bessere Strategien zu entwickeln um Reispflanzen resistent zu machen. In dieser Arbeit wurde für die Identifikation von TALE-Zielgenen eine RNAseq-Analyse durchgeführt. Dafür wurden *Nipponbare* Reispflanzen mit den *Xoo*-Stämmen PXO35, PXO83, PXO142 und ICMP3125 infiziert. Als Kontrolle, welche dem Vergleich der Expressionsmuster dient um TALE-abhängig exprimierte Gene zu ermitteln, wurden die Reispflanzen mit $MgCl_2$ infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Proben geerntet. Der Zeitpunkt nach 24 Stunden wurde gewählt um auf der einen Seite gute TALE-abhängige Expression der Gene zu bekommen und auf der anderen Seite so wenig wie möglich sekundäre Genexpressionen mit zu messen. Werden bestimmte Zielgene jedoch im Verlauf der Infektion von *Xoo* durch bestimmte TALEs induziert oder die TALEs induzieren Zielgene nur relativ schwach, kann es sein, dass man diese Zielgene in diesem Versuchsansatz nicht identifizieren kann. Daher wäre es gut, eine zweite RNAseq-Analyse durchzuführen, bei der man die Expressionsmuster zur $MgCl_2$ -Kontrolle und zwischen zwei verschiedenen Zeitpunkten, zum Beispiel 24 und 48 Stunden, miteinander vergleicht. Auf diese Weise könnte man Zielgene identifizieren, die nach 24 Stunden nur schwach induziert sind und welche erst im späteren Verlauf der Infektion durch TALEs induziert werden. Der Nachteil bei einem Zeitpunkt später als 24 Stunden ist jedoch, dass man mehr sekundäre Effekte, das heißt Induktion von Genen durch andere TALE-abhängig induzierte Gene, bekommen kann. Somit müssen die potentiellen Zielgene unbedingt in einem zweiten Schritt mit Hilfe einer qRT-PCR-Analyse validiert werden.

Die Analyse der RNAseq-Daten wurde von unserem Kooperationspartner Dr. Jan Grau durchgeführt. Dabei wurde als erstes für jeden *Xoo*-Stamm eine Liste mit differentiell exprimierten Genen erstellt. Anhand dieser Liste wurde dann mit Hilfe von TALgetter überprüft, ob potentielle Zielsequenzen der TALEs, welche dieser Stamm besitzt, vorhanden sind. Als Ergebnis habe ich für jeden Stamm eine Liste mit differentiell exprimierten Genen und den dazu vorhergesagten TALEs, welche dieses Gen induzieren könnten, bekommen. Um nun die potenziellen Zielgene zu identifizieren, welche mit der größten Wahrscheinlichkeit von dem jeweiligen TALE induziert werden, wurde ein Zielgen-score für jedes potentielle Zielgen vergeben (Kapitel 3.3.5.2). Anhand der erhaltenen Zielgen-scores wurden nun die Top-Kandidaten Zielgene ausgewählt (Tab. 3.3.5.3). Unter diesen waren Zielgene für die TALEs TalAQ, TalAO, TalAE, TalBA, TalCA, TalAB, TalAA, TalAL, TalAD. Für die aller meisten dieser TALEs gab es nur ein Top-Zielgen (Tab. 3.3.5.3.). Um zu überprüfen ob diese Top-Kandidaten wirklich Ziele dieser TALEs sind,

sollten diese potentiellen Zielgene mit Hilfe einer qRT-PCR-Analyse validiert werden. Dafür sollte zum einen mit der RNA, welche für die RNAseq verwendet wurde, getestet werden, ob die Induktion der Gene auch in einer qRT-PCR-Analyse nachgewiesen werden kann. Zum anderen sollten *Xoo*-Stämme generiert werden, welche nur einen künstlichen TALE besitzen. Mit diesen *Xoo*-Stämmen sollten dann Reispflanzen infiziert und die Induktion der potentiellen Zielgene überprüft werden. Aus zeitlichen Gründen konnte in dieser Arbeit nur die Überprüfung der RNAseq RNA-Proben durchgeführt werden. Dabei wurde die Induktion der potentiellen Zielgene für die TALEs TalAQ, TalAO und TalAB überprüft. Die Induktion aller vier getesteten Gene konnte nachgewiesen werden. Somit wurde der erste Schritt zur Validierung dieser Gene als Zielgene der TALEs gemacht. In weiteren Analysen muss nun überprüft werden, ob die Induktion der Gene wirklich von dem korrespondierenden TALE abhängig ist. Dabei sind das Flavonol-Synthase-Gen (*Os03g03034*) für TalAQ und das Phosphat-Transporter-Gen (*Os06g29790*) für TalAO die vielversprechendsten Kandidaten. Diese sollten als erstes mit Hilfe der in dieser Arbeit generierten *Xoo*-Stämme, welche die klonierten künstlichen artTals tragen (Abb. 3.3.5.4), getestet werden.

In der Masterarbeit von Claudia-Alice Schwietzer konnte, mit Hilfe der in dieser Arbeit generierten *Xoo*-Stämme (Kapitel 3.3.5.4), mittels qRT-PCR-Analyse nachgewiesen werden, dass TalAQ das Gen *Os03g03034* und TalAO das Gen *Os06g29790* direkt induziert. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass *Os03g03034* ein wichtiges Zielgen der TalAQ-Klasse und *Os06g29790* ein wichtiges Zielgen der TalAO-Klasse ist (Schwietzer, 2017). Daher wird im Folgenden auf diese beiden potentiellen Zielgene und den möglichen Effekt auf die Virulenz von *Xoo* näher eingegangen.

4.3.2.1 Das Zielgen *Os03g03034* der TalAQ-Klasse

Der TalAQ gehört zu den Gruppe 1 TALEs und ist somit in fast allen, in dieser Arbeit analysierten, *Xoo*-Stämmen zu finden. Dies lässt vermuten, dass der TALE und das induzierte Zielgen wichtig für die Virulenz von *Xoo* ist. Nun stellt sich die Frage, was die Funktion von *Os03g03034* im Infektionsprozess von *Xoo* ist. Für das Gen *Os03g03034* existieren fünf verschiedene Splice-Varianten. Bisherige Untersuchungen wurden jedoch meist mit der Variante *Os03g03034.1* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein Eigenschaften einer Flavon-Synthase-I besitzt (Kim *et al.*, 2008). In anderen Studien wird das Gen als Flavonol-Synthase/Flavonon-3-Hydrolase (FLS/F3H) beschrieben (Liu & Zhang, 2012; Cernadas *et al.*, 2014; Dufey *et al.*, 2015). Diese Proteine gehören zu der Familie der 2-Oxoglutarat-abhängige-Dioxygenasen (2ODD). Kawai und Kollegen haben 2ODD-Gene aus verschiedenen Pflanzenspezies klassifiziert. Dabei findet man *Os03g03034*, zusammen mit anderen Genen aus Reis und *Arabidopsis*, in der

Klasse DOXC38 (Abb. 4.3.2.1.1B; Kawai *et al.*, 2014)). Proteine dieser DOXC38-Klasse bauen Salicylsäure (SA) zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure (2,3-DHB) um (Abb. 4.3.2.1.1C).

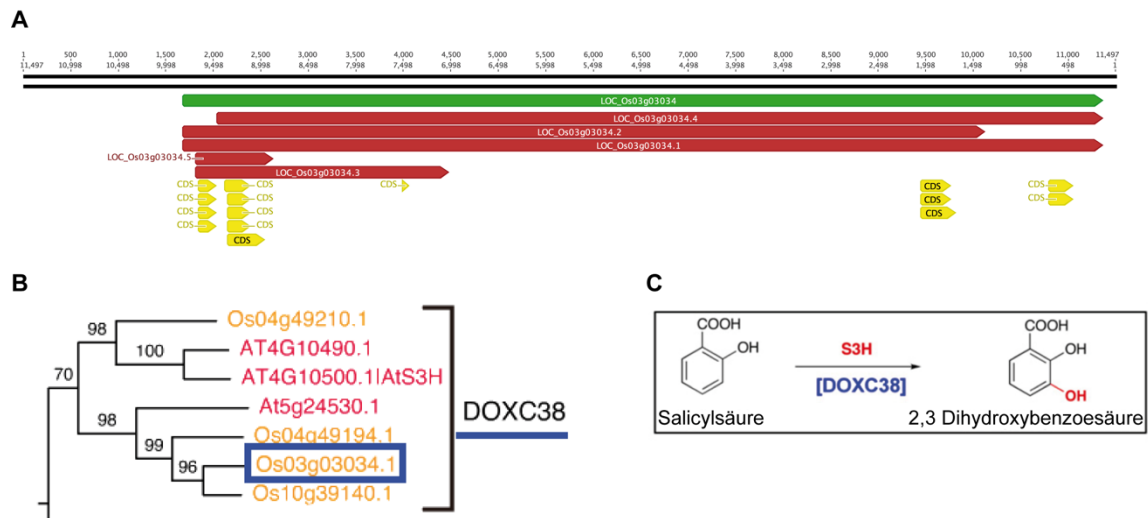


Abbildung 4.3.2.1.1 Genstruktur und Einteilung von Os03g03034. **A**) Dargestellt ist die Genstruktur von Os03g03034. Die komplette Sequenz des Gens ist in grün dargestellt. Es gibt fünf verschiedene mRNA Varianten (rot). Die korrespondierenden kodierenden Sequenzen sind darunter zu sehen (CDS in gelb). **B**) Ausschnitt aus der Einteilung der DOXC-Gene verändert nach Kawai *et al.*, 2014. Man kann erkennen, dass Os03g03034 (blau umrandet) zusammen mit drei weiteren Genen aus Reis und drei Genen aus *Arabidopsis* die Gruppe DOXC38 bilden. **C**) Funktion der Proteine der DOXC38 Gruppe. Diese Gene kodieren für Salicylsäure-3-Hydrolasen (S3H), welche Salicylsäure zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure umwandeln (verändert nach Kawai *et al.*, 2014).

SA hat in pflanzlichen Zellen verschiedene Aufgaben, unter anderem ist SA ein wichtiges Signalmolekül bei der pflanzlichen Abwehr von Pathogenen (Delaney *et al.*, 1994; Vlot *et al.*, 2009). Nach einer Infektion von pathogenen Bakterien, wie *Xoo*, produzieren die Pflanzenzellen SA. SA fungiert dann auf der einen Seite als Signalmolekül für verschiedenste Signalwege, um lokale Abwehrmechanismen anzuschalten. So werden z.B. MAPK-Signalwege oder die Expression von *NPR1* (*non-expressor of pathogenesis-related genes 1*) induziert (Vlot *et al.*, 2009). Am Ende dieser Signalwege kommt es zur Ausbildung einer pflanzlichen Abwehrreaktion gegen die pathogenen Bakterien (Abb. 4.3.2.1.2A). Auf der anderen Seite führt SA als Signalmolekül dazu, dass es in der Pflanze zu einer systemischen Abwehrantwort (SAR – *systemic acquired response*) kommt (Abb. 4.3.2.1.2A). Auf diese Weise werden die noch nicht direkt befallenen Zellen der Pflanze auf die drohende Gefahr vorbereitet und können so schneller und stärker eine Abwehrreaktion auslösen (Delaney *et al.*, 1994; Lawton *et al.*, 1995). SA ist somit ein wichtiger Angriffspunkt für bakterielle Effektoren, um die pflanzlichen Abwehrreaktionen unterdrücken zu können.

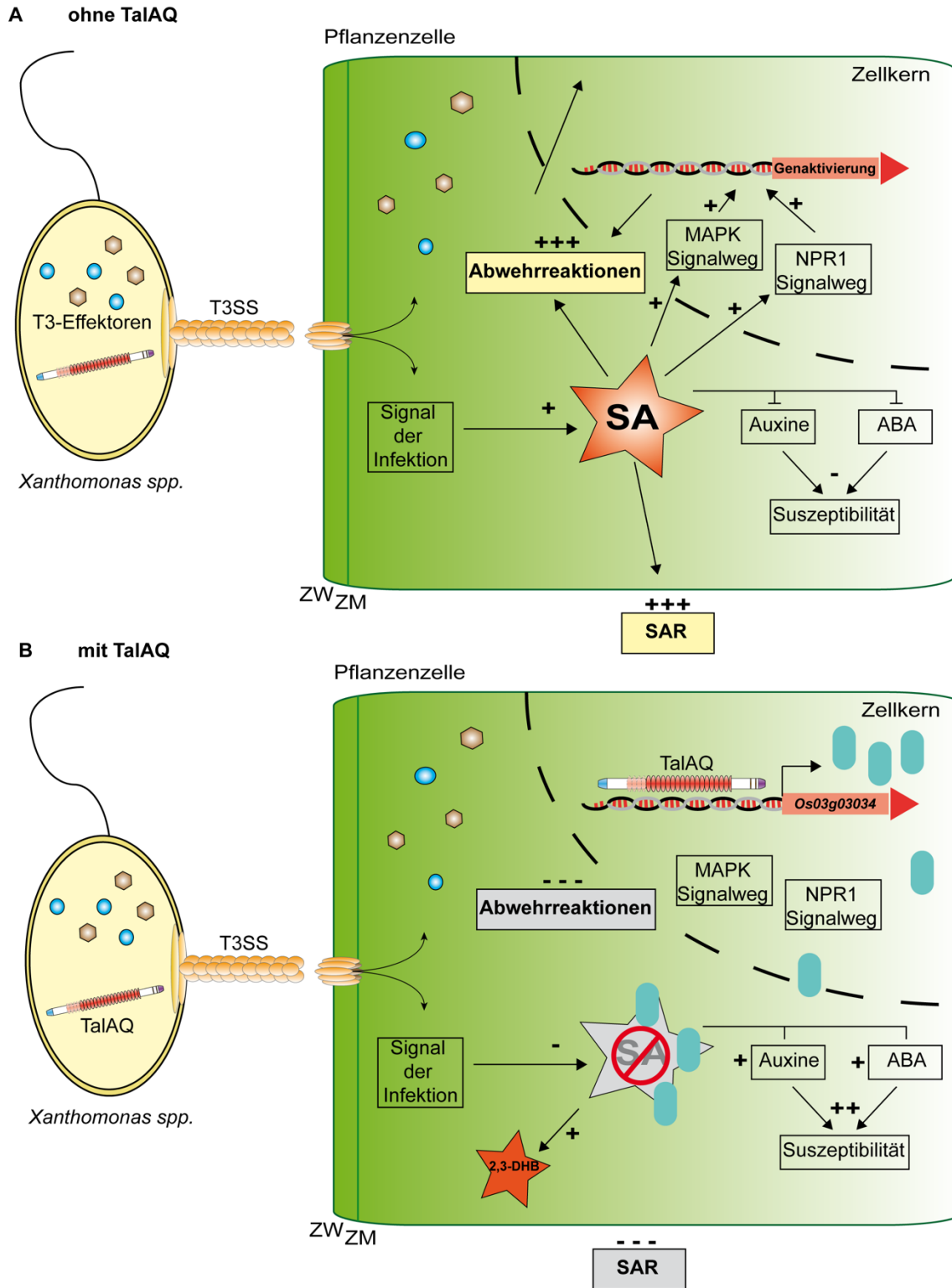


Abbildung 4.3.2.1.2 Model der möglichen Funktionsweise von TalAQ im Virulenzprozess von *Xoo*. **A)** Model der Funktionsweise von Salicylsäure (SA) bei der Auslösung von Abwehrreaktionen nach Infektionen. Signale der PTI oder ETI werden verarbeitet und es wird vermehrt SA produziert. SA unterdrückt andere Phytohormone wie Auxin oder Abscisinsäure (ABA), welche die Suszeptibilität der Pflanze erhöhen. Außerdem ist SA ein Signalmolekül für weitere Signalwege, welche dazu führen, dass Abwehrreaktionen in der Pflanzenzelle aktiviert werden. Weiterhin wird durch SA die systemisch erworbene Resistenz (SAR) aktiviert und die anderen Pflanzenteile auf die Infektion vorbereitet. **B)** Model der Funktionsweise von TalAQ. In Anwesenheit von TalAQ wird das Gen *Os03g03034* aktiviert, welches für ein Gen kodiert, welches Salicylsäure zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure (2,3-DHB) umwandelt. Dadurch wird vermutlich das SA-Level gesenkt. Somit kann SA nicht länger in ausreichendem Maße die Abwehrreaktionen einleiten und die Pflanze wird suszeptibler. ZW – Zellwand; ZM – Zellmembran; T3SS – Typ-III-Sekretionssystem.

Wie in Abbildung 4.3.2.1.1 zu sehen ist, gehört zu der Klasse der DOXC38-Gene das *Arabidopsis*-Gen *AtDMR6* (*At5g24530*). *AtDMR6* wurde als S-Gen für das *Downy-Mildew*-Pathogen *Hyaloperonospora parasitica* nachgewiesen (van Damme *et al.*, 2008; Falcone Ferreyra *et al.*, 2015). Inaktiviert man das *AtDMR6*-Gen, so kommt es zu einer Anreicherung von SA und einer erhöhten Resistenz gegenüber einer Infektion von *Pseudomonas syringae* auf *Arabidopsis*-Pflanzen (Falcone Ferreyra *et al.*, 2015). Das Ortholog aus Mais *ZmFNSI-1* kann diesen Phänotyp komplementieren und somit die Suszeptibilität wiederherstellen (Falcone Ferreyra *et al.*, 2015). Somit scheint die Aktivierung des Gens zu einer Verminderung des SA-Level zu führen und macht auf diese Weise die Pflanzen suszeptibler gegenüber bakteriellen Infektionen. Ein ähnlicher Effekt konnte beobachtet werden, wenn das Ortholog, *SIDMR6-1*, aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) mutiert wird (de Toledo Thomazella *et al.*, 2016). Durch die Mutation des Gens wurden die Tomatenpflanzen gegenüber Infektionen von *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas capsici* und *Xanthomonas* spp. resistent. Dies zeigt, dass das S-Gen *AtDMR6* in *Arabidopsis*-Pflanzen eine wichtige Rolle für die Virulenz von *Pseudomonas syringae* spielt (de Toledo Thomazella *et al.*, 2016). Eine ähnliche, wenn wahrscheinlich auch nicht ganz so wichtige, Rolle könnte *Os03g03034* als Zielgen von *TalAQ* in Reis spielen. Wenn der *TalAQ* die Expression von *Os03g03034* induziert, kann das Protein Flavone synthetisieren, welche dann das SA-Level senken. Dies könnte sein, da der Syntheseweg der Flavone und SA, Schnittstellen besitzt. *Os03g03034* könnte, ähnlich wie *DMR6*, die Umwandlung von Naringenin zu Apigenin erhöhen (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012, 2015). Apigenin könnte somit für die Hemmung von Enzymen oder der Expression von Genen im SA-Syntheseweg verantwortlich sein (Falcone Ferreyra *et al.*, 2015). Auf diese Weise wird das SA-Level in der Pflanze niedrig gehalten und SA kann seine Funktion als Signalmolekül nicht im erforderlichen Maße ausführen. In Folge dessen kommt es lokal und systemisch zur Unterdrückung der pflanzlichen Abwehrreaktionen. Dies könnte ein möglicher Weg von *Xoo*-Stämmen sein, um die pflanzliche Immunantwort zu unterdrücken und die Reispflanzen besser infizieren zu können.

Um diese Theorie zu überprüfen, wäre ein erster Schritt auf eine einfache Art und Weise das SA-Level in uninfizierten und infizierten Reispflanzen zu bestimmen. Für die Infektion könnte man z.B. die *Xoo*-Stämme PXO83, welcher ein funktionales *TalAQ*-Gen besitzt und PXO142, welcher kein funktionales *TalAQ*-Gen besitzt, nutzen. Als Negativkontrolle könnte man, wie bei der RNAseq-Analyse, $MgCl_2$ nutzen. Im Laufe dieser Arbeit konnte ein erstes Kontrollexperiment durchgeführt werden (Abb. 4.3.2.1.3). Dafür wurde mit der Methode nach Warriar und Kollegen eine SA-Messung in uninfizierten, mit $MgCl_2$ -infizierten und *Xoo* Roth1-8 infizierten Reispflanzen durchgeführt (R.Warriar *et al.*, 2013). Dabei sollte überprüft werden, ob es mit dieser Methode möglich ist, Unterschiede im SA-

Level der Pflanzen zu messen. Wie in Abbildung 4.3.2.1.3 zu sehen ist, können mit dieser Methode Unterschiede im SA-Level der Negativkontrollen und der mit dem *Xoo*-Stamm infizierten Probe, gemessen werden. Daher wäre es interessant ein solches Experiment mit den oben beschriebenen *Xoo*-Stämmen durchzuführen. Somit könnte man überprüfen, ob sich das SA-Level in Abhängigkeit von TalAQ ändert. Mit Hilfe dieses und weiterer Experimente kann man nun die Funktion von *Os03g03034* für die Virulenz von *Xoo* näher untersuchen und die Frage nach dem Beitrag von TalAQ zu Virulenz von *Xoo* klären.

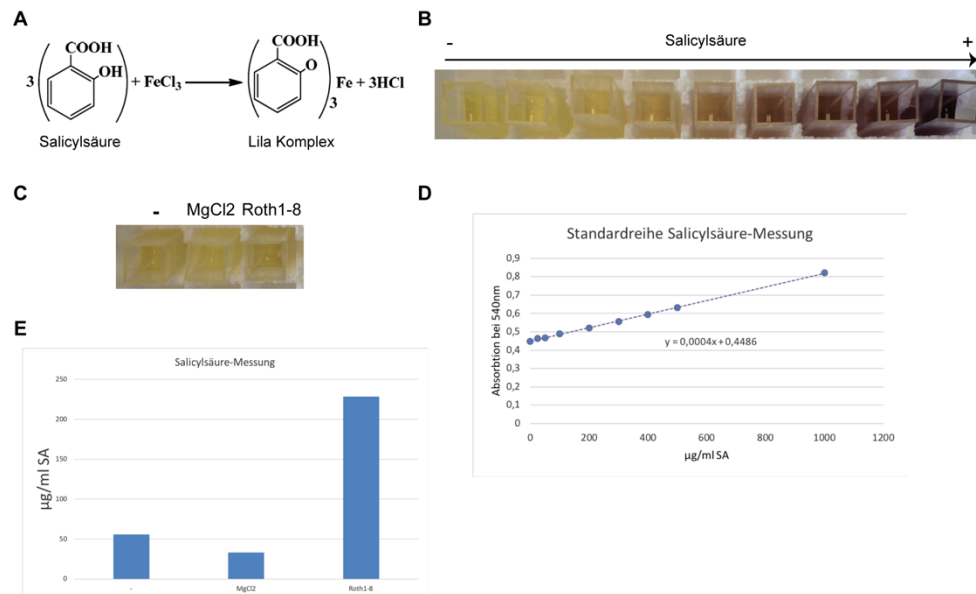


Abbildung 4.3.2.1.3 Photometrische Bestimmung der SA-Level in Reispflanzen. **A)** Chemische Reaktion der SA Nachweisreaktion. Durch die Reaktion von SA mit Eisen-III-Chlorid (FeCl_3) entsteht ein Lila Komplex. Dieser kann dann mittels photometrischer Bestimmung bei 540nm gemessen werden. **B)** Proben einer SA-Standardreihe. Wie man sehen kann, werden die Proben mit steigender SA-Konzentration dunkler. **C)** Proben der SA-Bestimmung aus infizierten Reispflanzen (- ist die Negativkontrolle nicht infizierte Reispflanze). Wie man schon an den Proben erkennen kann, ist die Roth1-8 Probe im Vergleich zu den beiden Kontrollen am dunkelsten. Dies deutet auf ein höheres SA-Level hin. **D)** Diagramm der SA-Standardkurve. Für die Standardkurve wurden neun verschiedene Konzentrationen von SA verwendet, 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 1000µg. Im Diagramm ist die Absorption bei 540nm gegen die SA-Konzentration in µg/ml aufgetragen. **E)** Messung der Proben. Für die SA-Level-Bestimmung wurden Reispflanzen mit MgCl_2 , dem *Xoo*-Stamm Roth1-8 oder nicht infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit warmem Wasser 10 Minuten gewaschen. Danach wurden die Proben mit einer FeCl_3 -Lösung vermischt und die Absorption bei 540nm gemessen. Wie man in dem Diagramm sehen kann, ist die SA-Konzentration, bei den mit dem *Xoo*-Stamm Roth1-8 infizierten Pflanzen, viermal so hoch wie in der Negativkontrolle (-).

4.3.2.2 Das Zielgen *Os06g29790* der TalAO-Klasse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Phosphat-Transporter-Gen, *Os06g29790* ein potentiell Zielgen der TALEs der Klasse AO ist. Der TalAO gehört ebenfalls zu den Gruppe 1 TALEs und ist somit in fast allen *Xoo*-Stämmen zu finden. Dies lässt vermuten, dass auch dieser TALE und das induzierte Zielgen wichtig für die Virulenz von *Xoo* sind. Eine andere Möglichkeit ist, dass eine Kombination von verschiedenen TALEs der Gruppe 1 und ein Zusammenspiel der Zielgene einen wichtigen Effekt auf die Virulenz von *Xoo* haben.

Das Gen *Os06g29790* kodiert für einen Phosphat-Permease-Transporter, OsPHO1;3. Diese Proteine transportieren anorganisches Phosphat (Pi) aus der Zelle in das Xylem und sorgen dafür, dass die Pi-Homöostase aufrecht gehalten wird (Wang *et al.*, 2008). Die Expression von *Os06g29790* wird hauptsächlich durch das intrazelluläre Pi-Level reguliert. Ein Mangel an Phosphor in der Pflanze induziert die Expression von *Os06g29790* sowohl im Spross als auch in den Wurzeln (Secco *et al.*, 2010). Das Protein OsPHO1;3 verfügt über eine N-terminale SPX- und eine C-terminale EXS-Domäne. Diese beiden Domänen sind für die Funktion des Proteins essentiell. Sie sorgen für die Lokalisierung des Proteins, für den Pi-Efflux und somit für die Regulation des Pi-Gleichgewichts (Secco *et al.*, 2012). Die Funktion des Reisproteins PHO1;3 wurde bisher nicht genau untersucht. Mit dem *Arabidopsis* Homolog AtPHO1 wurden hingegen genauere Untersuchungen hinsichtlich der Funktion in der Pflanze durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass AtPHO1 benötigt wird, um Pi aus den Wurzelzellen über das Xylem in die ganze Pflanze zu transportieren (Hamburger *et al.*, 2002; Stefanovic *et al.*, 2007, 2011). Dies legt nahe, dass auch OsPHO1;3 am Transport von Pi aus den Wurzelzellen ins Xylem beteiligt ist.

OsPHO1;3 transportiert Phosphor in das Xylem der Pflanzen. Phosphor ist ein essentielles Element für alle lebenden Organismen. Phosphat kann in Lipiden, Nukleinsäuren, Proteinen und Zuckern gefunden werden (Lamarche *et al.*, 2008). Es ist involviert in den Energie-Metabolismus, Signaltransduktion, Virulenz, Pathogenität und vieles mehr (Lamarche *et al.*, 2008; Crépin *et al.*, 2011; Pegos *et al.*, 2014). Phosphor kann auf verschiedenen Wegen die Virulenz von pathogenen Bakterien beeinflussen. So spielt Phosphor und die damit verbundene Regulation des Pho-Regulons, eine Rolle bei der Toleranz gegen Säuren, Toxinproduktion, Biofilmbildung und der Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen (Gajiwala & Burley, 2000; Lamarche *et al.*, 2008; Shi & Zhang, 2010; Yoshida *et al.*, 2010; Zaborin *et al.*, 2012; Santos-Beneit, 2015).

Xoo besiedelt bei der Infektion von Reispflanzen das Xylem und breitet sich so Stück für Stück systemisch in der ganzen Pflanze aus (Niño-Liu *et al.*, 2006; González *et al.*, 2012). Bei dieser Besiedelung des pflanzlichen Gewebes durch *Xanthomonas* spp. spielt der Phosphor-Metabolismus eine wichtige Rolle (Moreira *et al.*, 2015). Die Aufnahme von Phosphat erfolgt über das *pho* und *pst*-System der Bakterien. Dabei ist die Pi-Konzentration in der äußeren Umgebung, also im Xylem der Pflanze, wichtig, um die bakterielle Pi-Homöostase aufrechtzuerhalten (Lamarche *et al.*, 2008; Santos-Beneit, 2015). Induziert der TaIAO die Expression des Gens *Os06g29790*, so wird daraufhin vermutlich vermehrt Pi aus den pflanzlichen Zellen in das Xylem transportiert (Abb. 4.3.2.2). Auf diese Weise stellt *Xoo* sicher, dass ausreichend Phosphor in seiner unmittelbaren Umgebung vorhanden ist. Somit kann *Xoo* Pi aufnehmen und für zelluläre

Prozesse nutzen. Dadurch kann die Fitness und somit auch die Virulenz verbessert werden.

Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte man, ähnlich wie bei der Analyse der SA-Level, in infizierten und nicht infizierten Pflanzen die Konzentration an Pi im Xylemsaft messen. Dafür könnte man den *Xoo*-Stamm Roth1-8+artTalAO nutzen. Als Negativkontrolle könnte dabei der Wildtyp-Stamm Roth1-8 dienen. Auf diese Weise könnte man überprüfen, ob es Unterschiede zwischen den beiden *Xoo*-Stämmen gibt. Sind keine Unterschiede festzustellen, könnte man die Expression der TALEs in den Wildtyp-Stämmen, PXO35, PXO83, PXO142 und ICMP3125, in normalem Medium und in minimal-Medium, welches über wenig bis kein Phosphor verfügt, überprüfen.

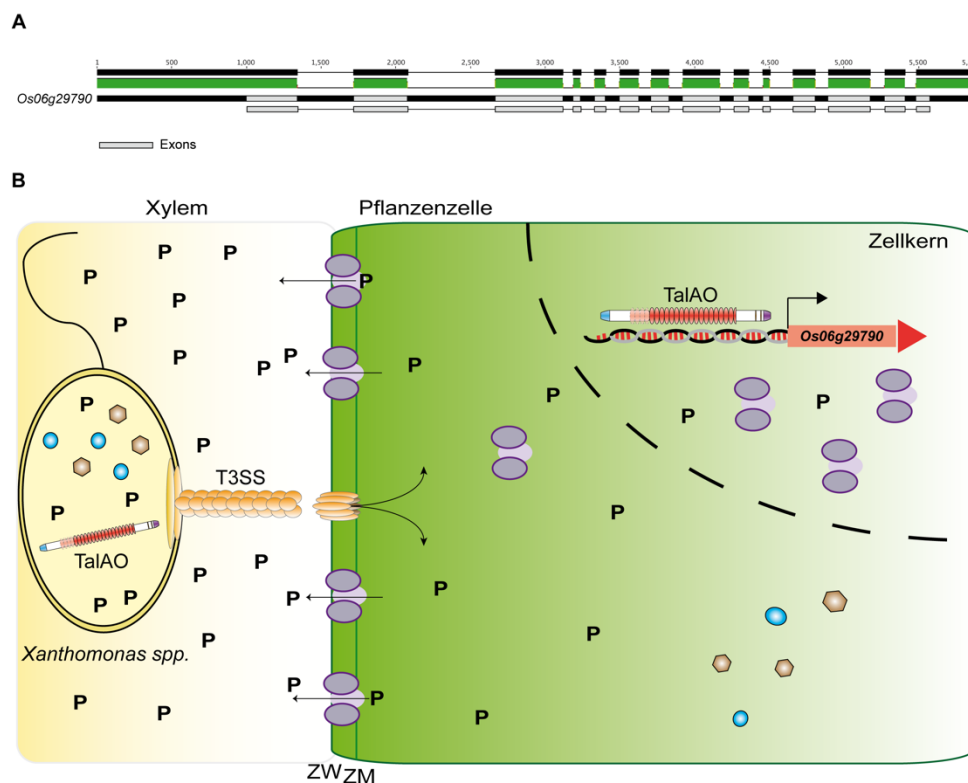


Abbildung 4.3.2.2 Modell der Funktion von TalAO bei der Virulenz von *Xoo*. **A)** Schematische Darstellung der Genstruktur von *Os06g29790* (*OsPHO1;3*). Dargestellt ist in schwarz die komplette Gensequenz inklusive Promotor. Darunter sind die Exons des Gens zu sehen (grau). **B)** Modell der Funktion von TalAO. In Anwesenheit von TalAO wird die Expression des Gens *Os06g29790* induziert. Daraufhin erhöht sich die Produktion des Phosphat-Transporters *OsPHO1;3* (lila). Dieser kann nun vermehrt Phosphor (P) aus der Pflanzenzelle in das Xylem transportieren. Dort könnte es dann von *Xoo* aufgenommen und verstoffwechselt werden.

Eventuell sind die TALEs der Gruppe 1, welche in fast jedem Stamm vorkommen, eine Art Notfallsystem. Vielleicht werden sie nur unter bestimmten, ungünstigen Umständen exprimiert, wenn andere Systeme, um die pflanzliche Abwehr zu unterdrücken und die Bakterien mit Nährstoffen zu versorgen, ausfallen. Somit wird sichergestellt, dass die Fitness und Virulenz der Bakterien aufrechterhalten werden kann. Dies würde im Umkehrschluss heißen, dass die TALEs der Gruppe 2 und 3 die spezialisierten TALEs mit

eigenständigen wichtigen Aufgaben sind. Beispiele dafür sind die TALEs TalAM, TalAC (Gruppe 3), TalBH und TalBX (Gruppe 2), welche Gene der *OsSWEET*-Familie induzieren und *Xoo* somit mit lebenswichtigem Zucker versorgen. Daher wäre es vor allem interessant Zielgene von TALEs dieser beiden Gruppen und somit neue Schlüssel-Virulenzfaktoren zu identifizieren. Besonders spannend ist in diesem Zusammenhang, der in dieser Arbeit sequenzierte und analysierte, *Xoo*-Stamm ICMP3125 und der Stamm PXO211. Diese beiden Stämme besitzen, als einer der wenigen, keinen *OsSWEET*-Gen induzierenden TALE. Daher wäre die Identifikation von Zielgenen, der Gruppe 2 und 3 TALEs dieser beiden Stämme besonders interessant und könnte neue wichtige Suszeptibilitätsgene zum Vorschein bringen.

4.3.3 Multiresistente Reispflanzen

Mit der Hilfe von spezifischen TALENs, welche in dieser Arbeit erstellt und getestet wurden, konnten durch unsere Kooperationspartner resistente Reispflanzen erstellt werden. Diese Reispflanzen wurden entweder in der *AvrXa7*-Box oder in der *TalC*-Box editiert, sodass *Xoo*-Stämme mit den korrespondierenden TALEs nicht länger virulent sind. Ein möglicher Nachteil dieser resistenten Reispflanzen kann sein, dass sich *Xoo*-Stämme relativ schnell an diese Resistenz anpassen könnten. Dafür könnten die *Xanthomonaden* durch Rekombination (Erkes *et al.*, 2017) oder horizontalen Gen-Transfer, einen TALE erhalten, der ein anderes *OsSWEET*-Gen induziert. Auf diese Weise könnte diese Resistenz von *Xoo* umgangen werden. In dieser Arbeit wurden potentielle Zielgene für 19 TALEs identifiziert, welche vorher noch nicht bekannt waren. Diese Zielgene müssen noch, wie die Zielgene von *TalAQ* und *TalAO* (Schwietzer, 2017), validiert werden. Sind die Zielgene validiert worden, kann man mit dem Wissen von weiteren Zielgenen resistente Reispflanzen erzeugen, bei denen mehrere TALE-Bindestellen editiert werden. Mutiert man z.B. alle bekannten TALE-Bindestellen in den Promotoren von *OsSWEET*-Genen, so ist es für *Xoo* schwieriger die Virulenz wiederherzustellen. Dadurch kann *Xoo* die Virulenz nicht durch einen anderen bisher identifizierten *OsSWEET*-Gen-induzierenden TALE wiederherstellen. Des Weiteren könnte man die TALE-Bindestellen weiterer Zielgene mutieren um auf diese Weise die unterstützenden Effekte der induzierten Gene zu unterdrücken. Somit könnten auf der einen Seite Reispflanzen generiert werden, welche gegen ein breites Spektrum von *Xoo*-Stämmen resistent sind. Auf der anderen Seite könnten die so generierten Resistenzen stabiler sein, da sie eventuell für die *Xanthomonaden* schwerer zu überwinden sind.

sgRNA Name	sgRNA Sequenz	Gene Nummer	Gene Name	zu mutierende TALE-Bindestelle von
sgRNA-AP	GGTGAAGTGGGGTTTAGGGA	Os07g06970	OsHen1	TalAP (PthXo8)
sgRNA-AQ	GAGTCAGGTGGCGGGGGGAG	Os03g03034	-	TalAQ (AvrXa23)
sgRNA-2g	CGATCAACAAGGAGAGGCTA	Os01g52130	OsSULTR3;6	TalBF (Tal2g BLS256)
sgRNA-BX	TTTTGGTGGTGTACAGTAGG	Os08g42350	OsWEET11	TalBX (PthXo1)
sgRNA-Ax7	TATATAAACCCCTCCAACC	Os11g31190	OsSWEET14	TalAC (AvrXa7)
sgRNA-TC	AGGGCATGCATGTCAGCAGC	Os11g31190	OsSWEET14	TalBS (TalC)
sgRNA-BM	GGGGAAGGGAGGAGGGGATT	Os01g73890	OsTFIIAy	TalBM (PthXo7)
sgRNA-AR	ACCTTTTCTCACCTATAAA	Os09g29820	OsTFX1	TalAR (PthXo6)

Tabelle 4.3.3 Übersicht über designte sgRNAs zur Generierung resistenter Reispflanzen

Zur Generierung solcher multiresistenten Reispflanzen eignet sich das CRISPRs/Cas9 bzw. das CRISPR/Cpf1 besonders gut. Bei diesen beiden Systemen ist es relativ einfach möglich, mehrere Mutationen mit einmal an unterschiedlichen Loci im Ziel-Genom einzufügen. Am Ende dieser Arbeit wurden für acht TALE Zielgene sgRNAs entworfen und angefangen mit dem System nach Ordon *et al.*, 2016 zu klonieren. In Tabelle 4.3.3. sind die Namen und Sequenzen der sgRNAs sowie das Zielgen und der TALE, dessen Bindestelle mutiert wird, zu sehen. Die Klonierung der sgRNA-Konstrukte müsste in folgenden Arbeiten fertig gestellt werden. Dann könnte man Reis-Kallus-Transformationen mit diesen Konstrukten durchführen. Man könnte als Ergebnis erwarten, dass man zum einen Reispflanzen erhält, bei denen alle acht Loci mutiert sind. Zum anderen könnte man aber auch Reispflanzen erhalten, bei denen Kombinationen aus den acht Loci mutiert sind. Daher müsste man die generierten Reispflanzen genau typisieren. Jedoch wäre es interessant, alle erhaltenen Reispflanzen im Hinblick auf Resistenzen gegenüber Infektionen mit verschiedenen *Xoo*-Stämmen genauer zu analysieren. Auch hier wäre es wieder besonders interessant, ob die beiden Stämme ICMP3125 und PXO211, welche keinen *OsSWEET*-Gen-induzierenden TALE besitzen, virulent auf den multiresistenten Reispflanzen sind. Die resistenten Reispflanzen, bei denen die *OsSWEET*-TALE-Bindestellen mutiert sind, könnte man so nutzen um wichtige Zielgene von TALEs dieser Stämme zu identifizieren.

Alles in allem konnte in dieser Arbeit der Grundstein zur Identifizierung neuer, bisher noch nicht bekannter, Zielgene von *Xoo* TALEs gelegt werden. In weiteren Arbeiten müssen diese potentiellen Zielgene nun validiert und die Funktion der Zielgene für die Virulenz von *Xoo* geklärt werden. Auf Grundlage der so erhaltenen Informationen wird es in Zukunft möglich sein, das Zusammenspiel von TALEs bei der Infektion von Reispflanzen besser verstehen sowie bessere Strategien zur Generierung resistenter Reispflanzen entwickeln zu können.

Literaturverzeichnis

- Van den Ackerveken G, Marois E, Bonas U. 1996.** Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* **87**: 1307–1316.
- Alfano JR, Collmer A. 2004.** Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual review of phytopathology* **42**: 385–414.
- Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, Ariga H, Uemura N, Takahashi R, Kinoshita M. 2013.** Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases. *Genetics* **193**: 739–49.
- Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu BB, White F, Yang B. 2010.** Rice xa13 recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-11N3. *The Plant cell* **22**: 3864–3876.
- AS Iyer-Pascuzzi, Jiang H, Huang L, SR McCouch, Iyer-Pascuzzi AS, Jiang H, Huang L, McCouch SR. 2008.** Genetic and Functional Characterization of the Rice Bacterial Blight Disease Resistance Genexa5. *Phytopathology* **98**: 289–295.
- Aslanidis C, de Jong PJ. 1990.** Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research* **18**: 6069–6074.
- Bai J, Choi SH, Ponciano G, Leung H, Leach JE. 2000.** Xanthomonas oryzae pv. oryzae avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **13**: 1322–9.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007.** CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* **315**: 1709–1712.
- Becker A, Katzen F, Pühler A, Ielpi L. 1998.** Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied microbiology and biotechnology* **50**: 145–52.
- Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug II RG, Tan W, Penheiter SG, Ma AC, Leung AYH, et al. 2012.** In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* **491**: 114–118.
- Beerli RR, Barbas CF. 2002.** Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nature Biotechnology* **20**: 135–141.
- Beerli RR, Dreier B, Barbas CF. 2000.** Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 1495–1500.
- Beerli RR, Segal DJ, Dreier B, Barbas CF. 1998.** Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14628–33.

- Begemann MB, Gray BN, January E, Gordon GC, He Y, Liu H, Wu X, Brutnell TP, Mockler TC, Oufattole M. 2017.** Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases. *Scientific Reports* **7**: 11606.
- Beumer KJ, Trautman JK, Christian M, Dahlem TJ, Lake CM, Hawley RS, Grunwald DJ, Voytas DF, Carroll D. 2013.** Comparing zinc finger nucleases and transcription activator-like effector nucleases for gene targeting in *Drosophila*. *G3 (Bethesda, Md.)* **3**: 1717–25.
- Bhakta MS, Henry IM, Ousterout DG, Das KT, Lockwood SH, Meckler JF, Wallen MC, Zykovich A, Yu Y, Leo H, et al. 2013.** Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly. *Genome research* **23**: 530–8.
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. 2011.** CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics* **45**: 273–297.
- Bi H, Yang B. 2017.** *Gene Editing With TALEN and CRISPR/Cas in Rice*. Academic Press.
- Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim Y-G, Chandrasegaran S. 2001.** Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 289–297.
- Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. 2002.** Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* **161**: 1169–75.
- Van Der Biezen EA, Jones JGD. 1998.** Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 454–456.
- Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I. 1998.** FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 10570–5.
- Blanvillain-Baufumé S, Reschke M, Solé M, Auguy F, Doucoure H, Szurek B, Meynard D, Portefaix M, Cunnac S, Guiderdoni E, et al. 2016.** Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors. *Plant biotechnology journal* **15**: 306–317.
- Block A, Li G, Fu ZQ, Alfano JR. 2008.** Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current opinion in plant biology* **11**: 396–403.
- Blount BA, Weenink T, Vasylechko S, Ellis T. 2012.** Rational Diversification of a Promoter Providing Fine-Tuned Expression and Orthogonal Regulation for Synthetic Biology (MF Tuite, Ed.). *PLoS ONE* **7**: e33279.
- Boch J, Bonas U. 2010.** *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual review of phytopathology* **48**: 419–436.
- Boch J, Bonas U, Lahaye T. 2014.** TAL effectors--pathogen strategies and plant

resistance engineering. *The New phytologist* **204**: 823–32.

Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science (New York, N.Y.)* **326**: 1509–1512.

Bogdanove AJ, Voytas DF. 2011. TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. *Science* **333**: 1843–1846.

Boller T, He SY. 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science (New York, N.Y.)* **324**: 742–4.

Bonas U, Conrads-Strauch J, Balbo I. 1993. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Molecular & general genetics : MGG* **238**: 261–9.

Bonas U, Stall RE, Staskawicz B. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular & general genetics : MGG* **218**: 127–36.

Booher NJ, Carpenter SCD, Sebra RP, Wang L, Salzberg SL, Leach JE, Bogdanove AJ. 2015. Single molecule real-time sequencing of *Xanthomonas oryzae* genomes reveals a dynamic structure and complex TAL (transcription activator-like) effector gene relationships. *Microbial genomics* **1**.

Budhagatapalli N, Rutten T, Gurushidze M, Kumlehn J, Hensel G. 2015. Targeted Modification of Gene Function Exploiting Homology-Directed Repair of TALEN-Mediated Double-Strand Breaks in Barley. *Genes|Genomes|Genetics* **5**: 1857–1863.

Bultmann S, Morbitzer R, Schmidt CS, Thanisch K, Spada F, Elsaesser J, Lahaye T, Leonhardt H. 2012. Targeted transcriptional activation of silent *oct4* pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Research* **40**: 5368–5377.

Burrill TJ. 1878. Report on botany and vegetable physiology. *Transactions of the Illinois State Horticultural Society* **11**: 114–116.

Burrill TJ. 1881. Bacteria as a cause of disease in plants. *American Naturalist* **15**: 527–531.

Büttner D, Bonas U. 2002. Port of entry--the type III secretion translocon. *Trends in microbiology* **10**: 186–92.

Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CBA, Fahrenkrug SC. 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 17382–17387.

Carroll D. 2011. Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. *Genetics* **188**: 773–

782.

Carroll D. 2014. Genome engineering with targetable nucleases. *Annual review of biochemistry* **83**: 409–39.

Carroll D, Morton JJ, Beumer KJ, Segal DJ. 2006. Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases. *Nature Protocols* **1**: 1329–1341.

Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller J a., Somia N V., Bogdanove AJ, Voytas DF. 2011. Erratum: Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting (Nucleic Acids Research (2011) 39 (e82) DOI: 10.1093/nar/gkr218). *Nucleic Acids Research* **39**: 7879.

Cernadas R a., Doyle EL, Niño-Liu DO, Wilkins KE, Bancroft T, Wang L, Schmidt CL, Caldo R, Yang B, White FF, et al. 2014. Code-Assisted Discovery of TAL Effector Targets in Bacterial Leaf Streak of Rice Reveals Contrast with Bacterial Blight and a Novel Susceptibility Gene (J-M Zhou, Ed.). *PLoS Pathogens* **10**: e1003972.

Chen LQ. 2014. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist* **201**: 1150–1155.

Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, et al. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527–532.

Choo Y, Klug A. 1994a. Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized fingers displayed on phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 11163–7.

Choo Y, Klug A. 1994b. Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 11168–72.

Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**: 756–761.

Christian M, Qi Y, Zhang Y, Voytas DF. 2013. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases.

Chu Z, Fu B, Yang H, Xu C, Li Z, Sanchez A, Park YJ, Bennetzen JL, Zhang Q, Wang S. 2006. Targeting xa13, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* **112**: 455–61.

Cong L, Ran FAF, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, et al. 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR / Cas Systems. *Science* **339**: 819–823.

Cong L, Zhou R, Kuo Y, Cunniff M, Zhang F. 2012. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nature*

Communications **3**: 968.

Crépin S, Chekabab SM, Le Bihan G, Bertrand N, Dozois CM, Harel J. 2011. The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* **153**: 82–88.

van Damme M, Huibers RP, Elberse J, Van den Ackerveken G. 2008. Arabidopsis DMR6 encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew. *The Plant Journal* **54**: 785–793.

DeKolver RC, Choi VM, Moehle EA, Paschon DE, Hockemeyer D, Meijsing SH, Sancak Y, Cui X, Steine EJ, Miller JC, et al. 2010. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Research* **20**: 1133–1142.

Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, et al. 1994. A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* **266**: 1247–1250.

Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu J-K, Shi Y, Yan N. 2012a. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science* **335**: 720–723.

Deng D, Yin P, Yan C, Pan X, Gong X, Qi S, Xie T, Mahfouz M, Zhu J-K, Yan N, et al. 2012b. Recognition of methylated DNA by TAL effectors. *Cell Research* **22**: 1502–1504.

Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature reviews. Genetics* **11**: 539–48.

Dong D, Ren K, Qiu X, Zheng J, Guo M, Guan X, Liu H, Li N, Zhang B, Yang D, et al. 2016. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature* **532**: 522–526.

Doudna JA, Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**: 1258096–1258096.

Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, Amora R, Hocking TD, Zhang L, Rebar EJ, et al. 2008. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology* **26**: 702–708.

Dreier B, Beerli RR, Segal DJ, Flippin JD, Barbas CF. 2001. Development of Zinc Finger Domains for Recognition of the 5'-ANN-3' Family of DNA Sequences and Their Use in the Construction of Artificial Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 29466–29478.

Dreier B, Fuller RP, Segal DJ, Lund C V., Blancafort P, Huber A, Koksche B, Barbas CF. 2005. Development of Zinc Finger Domains for Recognition of the 5'-CNN-3' Family DNA Sequences and Their Use in the Construction of Artificial Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 35588–35597.

Duan YP, Castañeda A, Zhao G, Erdos G, Gabriel DW. 1999. Expression of a Single,

Host-Specific, Bacterial Pathogenicity Gene in Plant Cells Elicits Division, Enlargement, and Cell Death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**: 556–560.

Dufey I, Mathieu A-S, Draye X, Lutts S, Bertin P. 2015. Construction of an integrated map through comparative studies allows the identification of candidate regions for resistance to ferrous iron toxicity in rice. *Euphytica* **203**: 59–69.

Endo A, Masafumi M, Kaya H, Toki S. 2016. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Scientific Reports* **6**: 38169.

Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. 2009. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. (J Peccoud, Ed.). *PLoS one* **4**: e5553.

Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. 2008. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability (HA El-Shemy, Ed.). *PLoS ONE* **3**: e3647.

Engler C, Marillonnet S. 2014. Golden Gate cloning. *Methods in Molecular Biology* **1116**: 119–131.

Engler C, Youles M, Gruetzner R, Ehnert TM, Werner S, Jones JDG, Patron NJ, Marillonnet S. 2014. A Golden Gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology* **3**: 839–843.

Erkes A, Reschke M, Boch J, Grau J. 2017. Evolution of Transcription Activator-Like Effectors in *Xanthomonas oryzae*. *Genome Biology and Evolution* **9**: 1599–1615.

Falcone Ferreyra ML, Emiliani J, Rodriguez EJ, Campos-Bermudez VA, Grotewold E, Casati P. 2015. The Identification of Maize and Arabidopsis Type I FLAVONE SYNTHASEs Links Flavones with Hormones and Biotic Interactions. *Plant physiology* **169**: 1090–107.

Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science* **3**: 222.

Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang D-L, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, et al. 2013. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research* **23**: 1229–32.

Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology* **32**: 279–84.

Gabsalilow L, Schierling B, Friedhoff P, Pingoud A, Wende W. 2013. Site- and strand-specific nicking of DNA by fusion proteins derived from MthH and I-SceI or TALE repeats. *Nucleic Acids Research* **41**: 1–11.

Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J. 1993. Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science* **261**: 754–756.

Gaj T, Gersbach C a., Barbas CF. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods

for genome engineering. *Trends in Biotechnology* **31**: 397–405.

Gaj T, Sirk SJ, Shui SL, Liu J. 2016. Genome-editing technologies: Principles and applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **8**.

Gajiwala KS, Burley SK. 2000. HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *Journal of Molecular Biology* **295**: 605–612.

Gao H, Wu X, Chai J, Han Z. 2012. Crystal structure of a TALE protein reveals an extended N-terminal DNA binding region. *Cell research* **22**: 1716–1720.

Garg A, Lohmueller JJ, Silver P a., Armel TZ. 2012. Engineering synthetic TAL effectors with orthogonal target sites. *Nucleic Acids Research* **40**: 7584–7595.

Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**: 67–71.

Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: E2579–E2586.

Geißler R, Scholze H, Hahn S, Streubel J, Bonas U, Behrens S-EE, Boch J, Geissler R, Scholze H, Hahn S, et al. 2011. Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity (S-H Shiu, Ed.). *PLoS ONE* **6**: 1–7.

Geu-Flores F, Nour-Eldin HH, Nielsen MT, Halkier BA. 2007. USER fusion: A rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Research* **35**: e55–e55.

Goff SA, Ricke D, Lan T-H, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science (New York, N.Y.)* **296**: 92–100.

González JF, Degrassi G, Devescovi G, De Vleeschauwer D, Höfte M, Myers MP, Venturi V. 2012. A proteomic study of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice xylem sap. *Journal of Proteomics* **75**: 5911–5919.

Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J. 2000. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **23**: 441–50.

Grau J, Reschke M, Erkes A, Streubel J, Morgan RD, Wilson GG, Koebnik R, Boch J. 2016. AnnoTALE: bioinformatics tools for identification, annotation, and nomenclature of TALEs from *Xanthomonas* genomic sequences. *Scientific Reports* **6**: 21077.

Grau J, Wolf A, Reschke M, Bonas U, Posch S, Boch J. 2013. Computational Predictions Provide Insights into the Biology of TAL Effector Target Sites (A Tresch, Ed.). *PLoS Computational Biology* **9**: e1002962.

- Greisman HA, Pabo CO. 1997.** A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science (New York, N. Y.)* **275**: 657–61.
- Gu K, Tian D, Qiu C, Yin Z. 2009.** Transcription activator-like type III effector AvrXa27 depends on OsTFIIAgamma5 for the activation of Xa27 transcription in rice that triggers disease resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology* **10**: 829–835.
- Gu K, Tian D, Yang F, Wu L, Sreekala C, Wang D, Wang GL, Yin Z. 2004.** High-resolution genetic mapping of Xa27(t), a new bacterial blight resistance gene in rice, *Oryza sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 800–807.
- Gu K, Yang B, Tian D, Wu L, Wang D, Sreekala C, Yang F, Chu Z, Wang G-L, White FF, et al. 2005.** R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* **435**: 1122–5.
- Guilinger JP, Pattanayak V, Reyon D, Tsai SQ, Sander JD, Joung JK, Liu DR. 2014.** Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nature methods* **11**: 429–35.
- Guo J, Gaj T, Barbas CF. 2010.** Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *Journal of Molecular Biology* **400**: 96–107.
- Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber Petétot J, Somerville C, Poirier Y. 2002.** Identification and characterization of the Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *The Plant cell* **14**: 889–902.
- Hayward AC. 1993.** The hosts of *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1–119.
- Heath MC. 2000.** Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current opinion in plant biology* **3**: 315–9.
- Herbers K, Conrads-Strauch J, Bonas U. 1992.** Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature* **356**: 172–174.
- Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKolver RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B, et al. 2009.** Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology* **27**: 851–857.
- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, et al. 2011.** Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature biotechnology* **29**: 731–734.
- Hsu PD, Scott D a, Weinstein J a, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, et al. 2013.** DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases.

Nature biotechnology **31**: 827–32.

Huang P, Xiao A, Zhou M, Zhu Z, Lin S, Zhang B. 2011. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nature biotechnology* **29**: 699–700.

Huang B, Xu JY, Hou MS, Ali J, Mou TM. 2012. Introgression of bacterial blight resistance genes Xa7, Xa21, Xa22 and Xa23 into hybrid rice restorer lines by molecular marker-assisted selection. *Euphytica* **187**: 449–459.

Hu X, Wang C, Liu Q, Fu Y, Wang K. 2017. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cpf1 system. *Journal of Genetics and Genomics* **44**: 71–73.

Hu Y, Zhang J, Jia H, Sosso D, Li T, Frommer WB, Yang B, White FF, Wang N, Jones JB. 2014. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: E521–E529.

Hückelhoven R. 2007. Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 101–127.

Hummel AW, Doyle EL, Bogdanove AJ. 2012. Addition of transcription activator-like effector binding sites to a pathogen strain-specific rice bacterial blight resistance gene makes it effective against additional strains and against bacterial leaf streak. *New Phytologist* **195**: 883–893.

Hur JK, Kim K, Been KW, Baek G, Ye S, Hur JW, Ryu SM, Lee YS, Kim JS. 2016. Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology* **34**: 807–808.

Hutin M, Pérez-Quintero AL, Lopez C, Szurek B. 2015. MorTAL Kombat: the story of defense against TAL effectors through loss-of-susceptibility. *Frontiers in Plant Science* **6**: 535.

Iyer AS, McCouch SR. 2004. The rice bacterial blight resistance gene xa5 encodes a novel form of disease resistance. *Molecular Plant Microbe Interactions* **17**: 1348–1354.

Izawa T, Shimamoto K. 1996. Becoming a model plant: The importance of rice to plant science. *Trends in Plant Science* **1**: 95–99.

Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research* **41**: 1–12.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J a., Charpentier E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**: 816–821.

Johnson RA, Gurevich V, Levy AA. 2013. A rapid assay to quantify the cleavage efficiency of custom-designed nucleases in planta. *Plant Molecular Biology* **82**: 207–221.

Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.

Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC. 1998. Molecular mechanisms of DNA double

strand break repair. *Trends in cell biology* **8**: 483–9.

Kawai Y, Ono E, Mizutani M. 2014. Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal* **78**: 328–343.

Kay S, Boch J, Bonas U. 2005. Characterization of AvrBs3-like effectors from a Brassicaceae pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 838–848.

Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648–651.

Kay S, Hahn S, Marois E, Wieduwild R, Bonas U. 2009. Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the Xanthomonas type III effectors AvrBs3 and AvrBs3^{rep16}. *Plant Journal* **59**: 859–871.

Kennedy D. 2002. The Importance of Rice. *Science* **296**: 13–13.

Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 1156–60.

Kim YG, Chandrasegaran S. 1994. Chimeric restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 883–7.

Kim JH, Cheon YM, Kim B-G, Ahn J-H. 2008. Analysis of flavonoids and characterization of the OsFNS gene involved in flavone biosynthesis in Rice. *Journal of Plant Biology* **51**: 97–101.

Kim Y, Cheong SA, Lee JG, Lee SW, Lee MS, Baek IJ, Sung YH. 2016a. Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting. *Nature Biotechnology* **34**: 808–810.

Kim H, Kim J-S. 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics* **15**: 321–334.

Kim H, Kim S-T, Ryu J, Choi MK, Kweon J, Kang B-C, Ahn H-M, Bae S, Kim J, Kim J-S, et al. 2016b. A simple, flexible and high-throughput cloning system for plant genome editing via CRISPR-Cas system. *Journal of Integrative Plant Biology* **58**: 705–712.

Kim J-S, Lee HJ, Carroll D. 2010. Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. *Nature Methods* **7**: 91–91.

Kim HK, Song M, Lee J, Menon AV, Jung S, Kang YM, Choi JW, Woo E, Koh HC, Nam JW, et al. 2017. In vivo high-throughput profiling of CRISPR-Cpf1 activity. *Nature Methods* **14**: 153–159.

Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, Nguyen NT, Welch MM, Lopez JM, McCaw ZR, Aryee MJ, Joung JK. 2016. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nature Biotechnology* **34**: 869–874.

Klug A. 2010. The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. *Annual Review of Biochemistry* **79**: 213–231.

- Koskiniemi S, Sun S, Berg OG, Andersson DI. 2012.** Selection-Driven Gene Loss in Bacteria (J Casadesús, Ed.). *PLoS Genetics* **8**: e1002787.
- Kühn J. 1858.** *Die Krankheiten der Kulturgewächse, ihre Ursachen und ihre Verhütung.*
- Lamarche MG, Wanner BL, Crépin S, Harel J. 2008.** The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 461–473.
- Lamb BM, Mercer AC, Barbas CF, III. 2013.** Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases. *Nucleic acids research* **41**: 9779–85.
- De Lange O, Binder A, Lahaye T. 2014.** From dead leaf, to new life: TAL effectors as tools for synthetic biology. *Plant Journal* **78**: 753–771.
- de Lange O, Schreiber T, Schandry N, Radeck J, Braun KH, Koszinowski J, Heuer H, Strauß A, Lahaye T. 2013.** Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. *New Phytologist* **199**: 773–786.
- Larebeke N Van, Engler G, Holsters M, Den Elsacker S Van, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J, Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, et al. 1974.** Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**: 169–170.
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J. 1995.** Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular plant-microbe interactions* **8**: 863–70.
- Leyns F, De Cleene M, Swings JG, De Ley J. 1984.** The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review* **50**: 308–356.
- Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. 2011.** TAL nucleases (TALNs): Hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research* **39**: 359–372.
- Li T, Huang S, Zhou J, Yang B. 2013a.** Designer TAL effectors induce disease susceptibility and resistance to *xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Molecular Plant* **6**: 781–789.
- Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, Li J, Gao C. 2016.** Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR–Cas9. *Nature Plants* **2**: 16139.
- Li Y, Moore R, Guinn M, Bleris L. 2012.** Transcription activator-like effector hybrids for conditional control and rewiring of chromosomal transgene expression. *Scientific Reports* **2**: 897.
- Li J-F, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. 2013b.** Multiplex and homologous recombination–mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology* **31**: 688–691.

- Li L, Wu LP, Chandrasegaran S. 1992.** Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 4275–9.
- Lieber MR. 2008.** The Mechanism of Human Nonhomologous DNA End Joining. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 1–5.
- Lieber MR. 2010.** The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry* **79**: 181–211.
- Liu W, Liu J, Triplett L, Leach JE, Wang G-L. 2014.** Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annual review of phytopathology* **52**: 213–41.
- Liu Q, Segal DJ, Ghiara JB, Barbas CF. 1997.** Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 5525–30.
- Liu Q, Yuan M, Zhou Y, Li X, Xiao J, Wang S. 2011.** A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant, cell & environment* **34**: 1958–69.
- Liu Q, Zhang H. 2012.** Molecular Identification and Analysis of Arsenite Stress-Responsive miRNAs in Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 6524–6536.
- Lu H, Patil P, Van Sluys M-A, White FF, Ryan RP, Dow JM, Rabinowicz P, Salzberg SL, Leach JE, Sonti R, et al. 2008.** Acquisition and Evolution of Plant Pathogenesis-Associated Gene Clusters and Candidate Determinants of Tissue-Specificity in *Xanthomonas* (P Wang, Ed.). *PLoS ONE* **3**: e3828.
- Ma S, Zhang S, Wang F, Liu YY, Liu YY, Xu H, Liu C, Lin Y, Zhao P, Xia Q. 2012.** Highly Efficient and Specific Genome Editing in Silkworm Using Custom TALENs. *PLoS ONE* **7**: 1–7.
- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, et al. 2015.** A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant* **8**: 1274–1284.
- Maeder ML, Angstman JF, Richardson ME, Linder SJ, Cascio VM, Tsai SQ, Ho QH, Sander JD, Reyon D, Bernstein BE, et al. 2013.** Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nature Biotechnology* **31**: 1137–1142.
- Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, et al. 2008.** Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Molecular cell* **31**: 294–301.
- Mahfouz MM. 2017.** Genome editing: The efficient tool CRISPR-Cpf1. *Nature Plants* **3**:

17028.

Mahfouz MM, Li L, Piatek M, Fang X, Mansour H, Bangarusamy DK, Zhu J-KK. 2012. Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein. *Plant Molecular Biology* **78**: 311–321.

Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman MM, Wibowo A, Fang X, Zhu J-KJ-K. 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 2623–2628.

Mak AN-SN-S, Bradley P, Cernadas R a., Bogdanove AJ, Stoddard BL. 2012. The Crystal Structure of TAL Effector PthXo1 Bound to Its DNA Target. *Science* **335**: 716–719.

Malzahn A, Lowder L, Qi Y. 2017. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell and Bioscience* **7**: 21.

Mansfield J, Genin SS, MAGORI S, CITOVSKY V, SRIARIYANUM M, Ronald P, Dow M, Verdier VV, BEER S V., MACHADO MA, et al. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**: 614–629.

Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu J-K. 2013. Application of the CRISPR–Cas System for Efficient Genome Engineering in Plants. *Molecular Plant* **6**: 2008–2011.

Marois E, Van den Ackerveken G, Bonas U. 2002. The *Xanthomonas* Type III Effector Protein AvrBs3 Modulates Plant Gene Expression and Induces Cell Hypertrophy in the Susceptible Host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 637–646.

Marraffini LA, Sontheimer EJ. 2008. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science* **322**: 1843–1845.

Meckler JF, Bhakta MS, Kim MS, Ovadia R, Habrian CH, Zykovich A, Yu A, Lockwood SH, Morbitzer R, Elsässer J, et al. 2013. Quantitative analysis of TALE-DNA interactions suggests polarity effects. *Nucleic Acids Research* **41**: 4118–4128.

Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, Wan J, Gu H, Qu L-J. 2013. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell research* **23**: 1233–6.

Mikami M, Toki S, Endo M. 2016. Precision Targeted Mutagenesis via Cas9 Paired Nickases in Rice. *Plant and Cell Physiology* **57**: 1058–1068.

Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee Y-L, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim K a, et al. 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature biotechnology* **25**: 778–785.

Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, et al. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology* **29**: 143–148.

Minczuk M, Papworth M a., Miller JC, Murphy MP, Klug A. 2008. Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated

- human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research* **36**: 3926–3938.
- Mishra D, Vishnupriya MR, Anil MG, Konda K, Raj Y, Sonti R V. 2013.** Pathotype and Genetic Diversity amongst Indian Isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (I Mokrousov, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e81996.
- Morbitzer R, Romer P, Boch J, Lahaye T, Römer P, Boch J, Lahaye T. 2010.** Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 21617–21622.
- Moreira LM, Facincani AP, Ferreira CB, Ferreira RM, Ferro MIT, Gozzo FC, de Oliveira JCF, Ferro JA, Soares MR. 2015.** Chemotactic signal transduction and phosphate metabolism as adaptive strategies during citrus canker induction by *Xanthomonas citri*. *Functional & Integrative Genomics* **15**: 197–210.
- Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009.** A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**: 1501.
- Moynahan ME, Jasin M. 2010.** Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**: 196–207.
- Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. 2011.** A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research* **39**: 9283–9293.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S. 2013.** Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology* **31**: 691–693.
- Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ. 2006.** *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* **7**: 303–324.
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. 2014.** Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell* **156**: 935–949.
- Nürnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004.** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews* **198**: 249–66.
- Ordon J, Gantner J, Kemna J, Schwalgun L, Reschke M, Streubel J, Boch J, Stuttmann J. 2016.** Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **89**: 155–168.
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. 1996.** The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes and Development* **10**: 2657–2683.
- Pabo CO, Peisach E, Grant RA. 2001.** Design and Selection of Novel Cys 2 His 2 Zinc

Finger Proteins. *Annual Review of Biochemistry* **70**: 313–340.

Pastwa E, Błasiak J. 2003. Non-homologous DNA end joining. *Acta biochimica Polonica* **50**: 891–908.

Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature biotechnology* **31**: 839–43.

Pegos VR, Nascimento JF, Sobreira TJP, Pauletti BA, Paes-Leme A, Balan A. 2014. Phosphate regulated proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: A proteomic approach. *Journal of Proteomics* **108**: 78–88.

Peng Z, Hu Y, Xie J, Potnis N, Akhunova A, Jones J, Liu Z, White FF, Liu S. 2016. Long read and single molecule DNA sequencing simplifies genome assembly and TAL effector gene analysis of *Xanthomonas translucens*. *BMC genomics* **17**: 21.

Pereira ALA, Carazzolle MF, Abe VY, de Oliveira MLP, Domingues MN, Silva JC, Cernadas RA, Benedetti CE. 2014. Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response. *BMC genomics* **15**: 157.

Perez-Pinera P, Ousterout DG, Brunger JM, Farin AM, Glass K a, Guilak F, Crawford GE, Hartemink AJ, Gersbach CA, Pablo Perez-Pinera, et al. 2013. Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors. *Nature methods* **10**: 239–42.

Perez LM, Redoña ED, Mendiolo MS, Vera Cruz CM, Leung H. 2008. Introgression of Xa4, Xa7 and Xa21 for resistance to bacterial blight in thermosensitive genetic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) for the development of two-line hybrids. *Euphytica* **164**: 627–636.

Porteus MH, Carroll D. 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature biotechnology* **23**: 967–973.

Puchta H. 2004. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1–14.

Puchta H, Fauser F. 2013. Gene targeting in plants: 25 years later. *International Journal of Developmental Biology* **57**: 629–637.

Qiu Z, Liu M, Chen Z, Shao Y, Pan H, Wei G, Yu C, Zhang L, Li X, Wang P, et al. 2013. High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Research* **41**: e120–e120.

Quibod IL, Perez-Quintero A, Booher NJ, Dossa GS, Grande G, Szurek B, Vera Cruz C, Bogdanove AJ, Oliva R. 2016. Effector Diversification Contributes to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Phenotypic Adaptation in a Semi-Isolated Environment. *Scientific Reports* **6**: 34137.

R.Warrier R, Paul M, Vineetha. M V. 2013. Estimation of salicylic acid in Eucalyptus

- leaves using spectrophotometric methods. *Genetics and Plant Physiology* **3**: 90–97.
- Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Müller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI, Winfrey RJ, Sander JD, Fu F, Townsend JA, et al. 2008.** Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature Methods* **5**: 374–375.
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott D a., Inoue A, Matoba S, Zhang Y, et al. 2013.** Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**: 1380–1389.
- Raskin I. 1992.** Role of Salicylic Acid in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 439–463.
- Reschke M. 2012.** Gerichtete Genommodifikation in Modellpflanzen.
- Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden J a, Sander JD, Joung JK. 2012.** FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology* **30**: 460–465.
- Richter A, Streubel J, Blücher C, Szurek B, Reschke M, Grau J, Boch J. 2014.** A TAL effector repeat architecture for frameshift binding. *Nature communications* **5**: 3447.
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, Lahaye T. 2007.** Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science (New York, N.Y.)* **318**: 645–648.
- Römer P, Recht S, Lahaye T. 2009.** A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 20526–20531.
- Romer P, Strauss T, Hahn S, Scholze H, Morbitzer R, Grau J, Bonas U, Lahaye T. 2009.** Recognition of AvrBs3-Like Proteins Is Mediated by Specific Binding to Promoters of Matching Pepper Bs3 Alleles. *PLANT PHYSIOLOGY* **150**: 1697–1712.
- Rouxel T, Balesdent M-H. 2010.** Avirulence Genes. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491.
- Salzberg SL, Sommer DD, Schatz MC, Phillippy AM, Rabinowicz PD, Tsuge S, Furutani A, Ochiai H, Delcher AL, Kelley D, et al. 2008.** Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC genomics* **9**: 204.
- Sambrook J, Russell DW (David W. 2001.** *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh J-RJ. 2011.** Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature*

biotechnology **29**: 697–698.

Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. 2012. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature Protocols* **7**: 171–192.

Santos-Beneit F. 2015. The Pho regulon: A huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology* **6**: 402.

Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Höning K, Hornung V. 2013. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nature biotechnology* **31**: 76–81.

Scholze H, Boch J. 2011. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology* **14**: 47–53.

Schornack S, Ballvora A, Gürlebeck D, Peart J, Ganai M, Baker B, Bonas U, Lahaye T. 2004. The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant Journal* **37**: 46–60.

Schornack S, Meyer A, Römer P, Jordan T, Lahaye T. 2006. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Journal of plant physiology* **163**: 256–72.

Schornack S, Minsavage G V, Stall RE, Jones JB, Lahaye T. 2008. Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. *New Phytologist* **179**: 546–556.

Schornack S, Moscou MJ, Ward ER, Horvath DM. 2013. Engineering plant disease resistance based on TAL effectors. *Annual review of phytopathology* **51**: 383–406.

Schwietzer C-A. 2017. Ziele von TAL-Effektoren aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in *Oryza sativa*. *Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover*.

Secco D, Baumann A, Poirier Y. 2010. Characterization of the Rice PHO1 Gene Family Reveals a Key Role for OsPHO1;2 in Phosphate Homeostasis and the Evolution of a Distinct Clade in Dicotyledons. *PLANT PHYSIOLOGY* **152**: 1693–1704.

Secco D, Wang C, Arpat BA, Wang Z, Poirier Y, Tyerman SD, Wu P, Shou H, Whelan J. 2012. The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis. *New Phytologist* **193**: 842–851.

Segal DJ, Dreier B, Beerli RR, Barbas CF, III. 1999. Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 2758–63.

Senthil-Kumar M, Mysore KS. 2013. Nonhost Resistance Against Bacterial Pathogens: Retrospectives and Prospects. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 407–427.

Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu J-L, et al.

- 2013.** Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* **31**: 686–688.
- Shi W, Zhang Y. 2010.** PhoY2 but not PhoY1 is the PhoU homologue involved in persistence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**: 1237–1242.
- Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, et al. 2017.** Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **15**: 169–182.
- Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy a R, Chandrasegaran S, Carroll D. 2000.** Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic acids research* **28**: 3361–3369.
- Stefanovic A, Arpat AB, Bligny R, Gout E, Vidoudez C, Bensimon M, Poirier Y. 2011.** Over-expression of PHO1 in *Arabidopsis* leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *Plant Journal* **66**: 689–699.
- Stefanovic A, Ribot C, Rouached H, Wang Y, Chong J, Belbahri L, Delessert S, Poirier Y. 2007.** Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant Journal* **50**: 982–994.
- Steinert J, Schiml S, Puchta H. 2016.** *Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants.*
- Stella S, Montoya G. 2016.** The genome editing revolution: A CRISPR-Cas TALE off-target story Engineered nucleases and DNA repair. *Inside the Cell* **1**: 7–16.
- Streubel J, Baum H, Grau J, Stuttmann J, Boch J. 2017.** Dissection of TALE-dependent gene activation reveals that they induce transcription cooperatively and in both orientations (RA Wilson, Ed.). *PLOS ONE* **12**: e0173580.
- Streubel J, Blücher C, Landgraf A, Boch J. 2012.** TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nature Biotechnology* **30**: 593–595.
- Streubel J, Pesce C, Hutin M, Koebnik R, Boch J, Szurek B. 2013.** Five phylogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* **200**: 808–819.
- Sugio A, Yang B, Zhu T, White FF. 2007.** Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes *OstFIIAgamma1* and *OstTFX1* during bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 10720–5.
- Sun N, Liang J, Abil Z, Zhao H. 2012.** Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Molecular BioSystems* **8**: 1255.
- Sun N, Zhao H. 2013.** Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): A highly

- efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnology and Bioengineering* **110**: 1–29.
- Sun N, Zhao H. 2014.** A single-chain TALEN architecture for genome engineering. *Molecular bioSystems* **10**: 446–53.
- Svitashev S, Young JK, Schwartz C, Gao H, Falco SC, Cigan AM. 2015.** Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant Physiology* **169**: 931–945.
- Swarup S, De Feyter R, Brlansky RH, Gabriel DW. 1991.** A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology* **81**: 802–809.
- Świat MA, Dashko S, den Ridder M, Wijsman M, van der Oost J, Daran J-M, Daran-Lapujade P. 2017.** FnCpf1: a novel and efficient genome editing tool for *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **45**: 12585–12598.
- Szczepek M, Brondani V, Büchel J, Serrano L, Segal DJ, Cathomen T. 2007.** Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology* **25**: 786–793.
- Szurek B, Marois E, Bonas U, Van Ackerveken G Den, Van den Ackerveken G. 2001.** Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: Protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant Journal* **26**: 523–534.
- Szurek B, Rossier O, Hause G, Bonas U. 2002.** Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular microbiology* **46**: 13–23.
- Tan W, Carlson DF, Lancto CA, Garbe JR, Webster DA, Hackett PB, Fahrenkrug SC. 2013.** Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 16526–16531.
- Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, Zhong Z, Chen Y, Ren Q, Li Q, et al. 2017.** A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nature Plants* **3**: 17018.
- Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Buttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goemann A, Kay S, et al. 2005.** Insights into Genome Plasticity and Pathogenicity of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Revealed by the Complete Genome Sequence. *Journal of Bacteriology* **187**: 7254–7266.
- Thomas MC, Chiang CM. 2006.** The general transcription machinery and general cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **41**: 105–178.
- Thurtle-Schmidt DM, Lo TW. 2018.** Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*.

- Tian D, Wang J, Zeng X, Gu K, Qiu C, Yang X, Zhou Z, Goh M, Luo Y, Murata-Hori M, et al. 2014.** The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *The Plant cell* **26**: 497–515.
- de Toledo Thomazella DP, Brail Q, Dahlbeck D, Staskawicz BJ. 2016.** CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance.
- Uhde-Stone C, Cheung E, Lu B. 2014.** TALE activators regulate gene expression in a position- and strand-dependent manner in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* **443**: 1189–94.
- Ungerer J, Pakrasi HB. 2016.** Cpf1 Is A Versatile Tool for CRISPR Genome Editing Across Diverse Species of Cyanobacteria. *Scientific Reports* **6**: 39681.
- Urnov FD, Miller JC, Lee Y-L, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. 2005.** Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**: 646–651.
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. 2010.** Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews. Genetics* **11**: 636–646.
- Valton J, Dupuy A, Daboussi F, Thomas S, Marechal A, Macmaster R, Melliand K, Juillerat A, Duchateau P. 2012.** Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 38427–38432.
- Vanamee ÉS, Santagata S, Aggarwal AK. 2001.** FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *Journal of Molecular Biology* **309**: 69–78.
- Vera Cruz CM, Bai J, Ona I, Leung H, Nelson RJ, Mew TW, Leach JE. 2000.** Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13500–5.
- Verdier V, Triplett LR, Hummel AW, Corral R, Cernadas RA, Schmidt CL, Bogdanove AJ, Leach JE. 2012.** Transcription activator-like (TAL) effectors targeting OsSWEET genes enhance virulence on diverse rice (*Oryza sativa*) varieties when expressed individually in a TAL effector-deficient strain of *Xanthomonas oryzae*. *New Phytologist* **196**: 1197–1207.
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. 2009.** Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177–206.
- Wang C, Fan Y, Zheng C, Qin T, Zhang X, Zhao K. 2014a.** High-resolution genetic mapping of rice bacterial blight resistance gene Xa23. *Molecular Genetics and Genomics* **289**: 745–753.
- Wang J, Friedman G, Doyon Y, Wang NS, Li CJ, Miller JC, Hua KL, Yan JJ, Babiarz**

- JE, Gregory PD, et al. 2012.** Targeted gene addition to a predetermined site in the human genome using a ZFN-based nicking enzyme. *Genome Research* **22**: 1316–1326.
- Wang M, Lu Y, Botella JR, Mao Y, Hua K, kang Zhu J. 2017.** Gene Targeting by Homology-Directed Repair in Rice Using a Geminivirus-Based CRISPR/Cas9 System. *Molecular Plant*: 1–4.
- Wang C, Qin T-FF, Yu H-MM, Zhang X-PP, Che J-YY, Gao Y, Zheng C-KK, Yang B, Zhao K-JJ. 2014b.** The broad bacterial blight resistance of rice line CBB23 is triggered by a novel transcription activator-like (TAL) effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology* **15**: 333–341.
- Wang Y, Secco D, Poirier Y. 2008.** Characterization of the PHO1 gene family and the responses to phosphate deficiency of *Physcomitrella patens*. *Plant physiology* **146**: 646–56.
- Wang C, Zhang X, Fan Y, Gao Y, Zhu Q, Zheng C, Qin T, Li Y, Che J, Zhang M, et al. 2015.** XA23 Is an executor r protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Molecular Plant* **8**: 290–302.
- Warrens AN, Jones MD, Lechler RI. 1997.** Splicing by over-lap extension by PCR using asymmetric amplification: An improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* **186**: 29–35.
- Weber E, Gruetzner R, Werner S, Engler C, Marillonnet S. 2011.** Assembly of designer tal effectors by golden gate cloning. *PLoS ONE* **6**: e19722.
- Wefers B, Meyer M, Ortiz O, Hrabé de Angelis M, Hansen J, Wurst W, Kühn R. 2013.** Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 3782–7.
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. 2012.** RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**: 331–338.
- Wilhelm S, Tietz H. 1978.** Julius Kuehn-His Concept of Plant Pathology. *Annual Review of Phytopathology* **16**: 343–358.
- Wilkins KE, Booher NJ, Wang L, Bogdanove AJ. 2015.** TAL effectors and activation of predicted host targets distinguish Asian from African strains of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* while strict conservation suggests universal importance of five TAL effectors. *Frontiers in plant science* **6**: 536.
- Wood AJ, Lo T-W, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, Amora R, Miller JC, Leung E, Meng X, et al. 2011.** Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science (New York, N.Y.)* **333**: 307.
- Wyman C, Kanaar R. 2006.** DNA Double-Strand Break Repair: All's Well that Ends Well. *Annual Review of Genetics* **40**: 363–383.

- Xu R, Qin R, Li H, Li D, Li L, Wei P, Yang J. 2017.** Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system. *Plant Biotechnology Journal* **15**: 713–717.
- Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, Fedorova I, Nakane T, Makarova KS, Koonin EV, et al. 2016.** Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell* **165**: 949–962.
- Yang B, Sugio A, White FF. 2006.** Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 10503–10508.
- Yang B, White FF. 2004.** Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **17**: 1192–200.
- Yang J, Zhang Y, Yuan P, Zhou Y, Cai C, Ren Q, Wen D, Chu C, Qi H, Wei W. 2014.** Complete decoding of TAL effectors for DNA recognition. *Cell research* **24**: 628–631.
- Yang B, Zhu W, Johnson LB, White FF. 2000.** The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 9807–9812.
- Yoshida Y, Sugiyama S, Oyamada T, Yokoyama K, Makino K. 2010.** Identification and characterization of novel phosphate regulon genes, ecs0540-ecs0544, in *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Genetics and Genomics* **284**: 197–205.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GKS, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, et al. 2002.** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**: 79–92.
- Yuan M, Ke Y, Huang R, Ma L, Yang Z, Chu Z, Xiao J, Li X, Wang S. 2016.** A host basal transcription factor is a key component for infection of rice by TALE-carrying bacteria. *eLife* **5**: e19605.
- Yuan M, Wang S. 2013.** Rice MtN3/saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. *Molecular Plant* **6**: 665–674.
- Yu Y, Streubel J, Balzergue S, Champion A, Boch J, Koebnik R, Feng J, Verdier V, Szurek B. 2011.** Colonization of rice leaf blades by an african strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice nodulin-3 Os11N3 gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* **24**: 1102–1113.
- Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu P-Q, Paschon DE, Miranda E, Ordóñez A, Hannan NRF, Rouhani FJ, et al. 2011.** Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* **478**: 391–394.
- Zaborin A, Gerdes S, Holbrook C, Liu DC, Zaborina OY, Alverdy JC. 2012.** *Pseudomonas aeruginosa* overrides the virulence inducing effect of opioids when it

senses an abundance of phosphate (N Ahmed, Ed.). *PLoS ONE* **7**: e34883.

Zeng X, Tian D, Gu K, Zhou Z, Yang X, Luo Y, White FF, Yin Z. 2015. Genetic engineering of the Xa10 promoter for broad-spectrum and durable resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Biotechnology Journal* **13**: 993–1001.

Zetsche B, Gootenberg JSS, Abudayyeh OOO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, et al. 2015a. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **163**: 1–13.

Zetsche B, Volz SE, Zhang F. 2015b. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nature Biotechnology* **33**: 139–142.

Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. 2011. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nature Biotechnology* **29**: 149–154.

Zhang F, Maeder ML, Unger-wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li X, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T, et al. 2010. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 12028–12033.

Zhang J, Yin Z, White F. 2015. TAL effectors and the executor R genes. *Frontiers in Plant Science* **6**: 641.

Zheng CK, Wang CL, Zhang XP, Wang FJ, Qin TF, Zhao KJ. 2014. The last half-repeat of transcription activator-like effector (TALE) is dispensable and thereby TALE-based technology can be simplified. *Molecular Plant Pathology* **15**: 690–697.

Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research* **42**: 10903–10914.

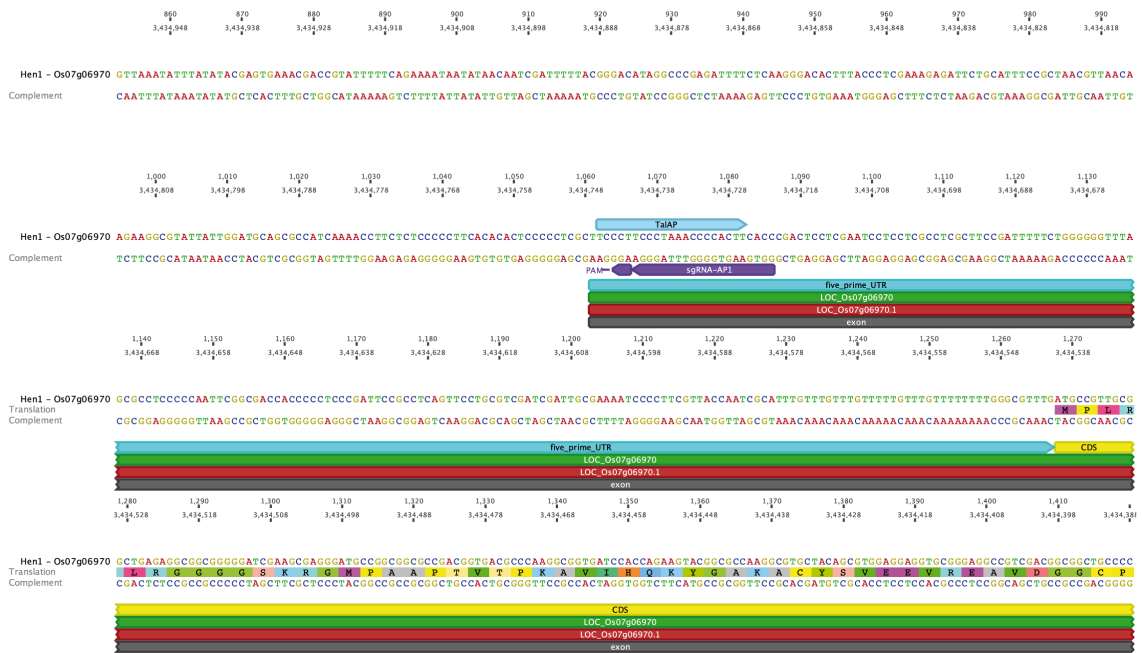
Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, Eom J-SS, Huang S, Liu S, Vera Cruz C, Frommer WB, et al. 2015. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant Journal* **82**: 632–643.

Zhu W, Yang B, Chittoor JM, Johnson LB, White FF. 1998. AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **11**: 824–832.

Zou J, Mali P, Huang X, Dowey SN, Cheng L. 2011. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood* **118**: 4599–4608.

Anhang

A



B

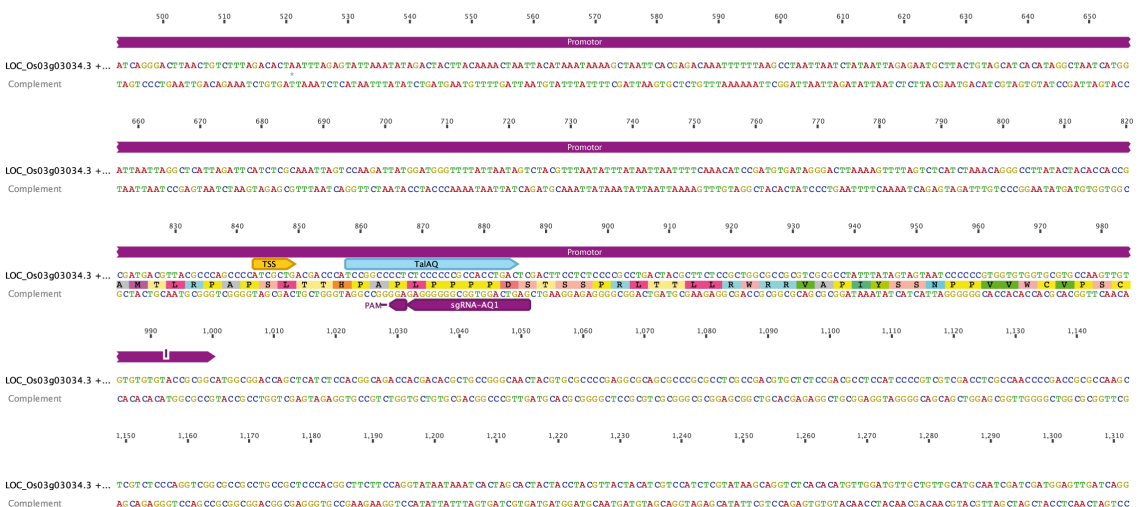


Abbildung 5.1 Lage der entworfenen sgRNA-AP und -AQ. A) Lage der sgRNA-AP im *OsHen1*-Gen. B) Lage der sgRNA-AQ im Gen *Os03g03034*. Vergleiche Tabelle 4.3.3.

A

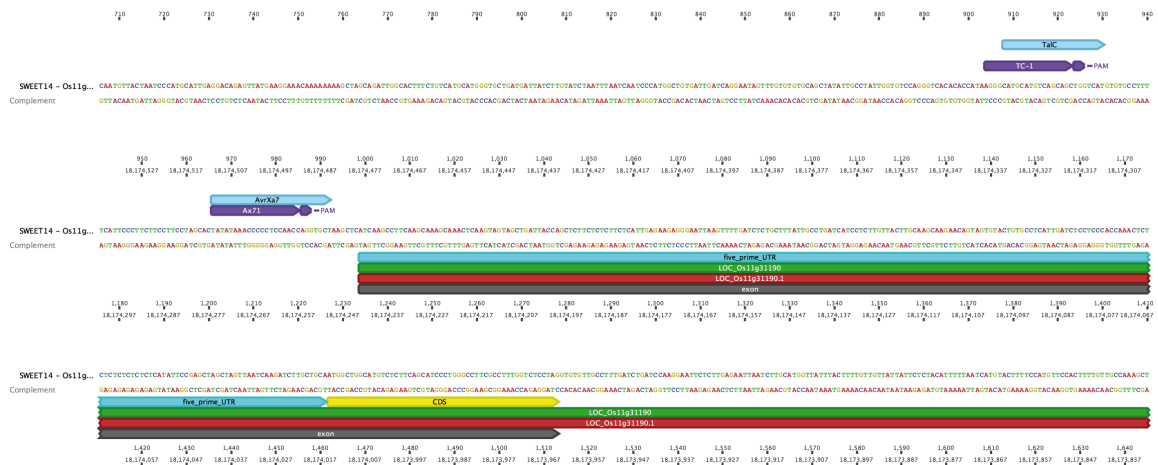


Abbildung 5.3 Lage der entworfenen sgRNA-Ax7 und -TC. Lage der sgRNA-Ax7 und sgRNA-TC Gen *OsSWEET14*. Vergleiche Tabelle 4.3.3.

MR-49LA	LA	NI-HG-NI-NI-NI-NN	
MR-49AB	AB	HD-NS-NN-NS-NN-HD	Tal AB2
MR-49BR	BR	NN-NI-HD-NN-NS-NG	
MR-50LA	LA	NI-HG-NS-HG-HG-HD	
MR-50AB	AB	NS-NG-HD-NN-NG-HG	Tal AA2
MR-50BC	BC	NG-HD-HG-HD-HD-NI	
MR-50CR	CR	NN-NG	
MR-51LA	LA	NI-N*-NI-HG-NI-NI	
MR-51AB	AB	NS-HD-NN-HD-NS-NG	Tal AN2
MR-51BC	BC	SS-HD-NI-NI-NN-NI	
MR-51CR	CR	NN-NS-NG	
MR-52LA	LA	NI-N*-NI-NS-NN-NG	
MR-52AB	AB	NN-NS-N*-NS-NN-NS	Tal AH2
MR-52BC	BC	N*-HD-HG-HD-NI-HD	
MR-52CR	CR	HD-NG	
MR-53LA	LA	NI-NG-NI-NI-N*-NG	
MR-53AB	AB	HD-HD-N*-NI-NI-NI	Tal BM1
MR-53BC	BC	HD-NG-HD-HG-NN-NS	
MR-53CR	CR	NN-HD-HD-NG-N*	
MR-54LA	LA	NI-NG-NN-NG-NK-NG	
MR-54AB	AB	NI-NN-NI-NN-NI-NN	Tal AG2
MR-54BC	BC	NS-NG-NS-NN-NI-N*	
MR-54CR	CR	NS-NG	
MR-55LA	LA	NI-NN-NN-NI-NI-NI	
MR-55AB	AB	HD-NS-HG-NN-NN-NN	Tal AF2
MR-55BR	BR	NI-NI-NG-HD	
MR-56LA	LA	NI-NN-NN-NI-NI-NI	
MR-56AB	AB	HD-NS-HG-NN-NN-NN	Tal AF1
MR-56BR	BR	NI-NI-HG-HD	
MR-57LA	LA	NI-NS-HD-HG-NS-NN	
MR-57AB	AB	HD-H*-NG-NN-NN-HD	Tal BA1
MR-57BR	BR	HD-NG-HD-NG	
MR-58LA	LA	NN-HD-NI-HG-HD-NG	
MR-58AB	AB	N*-HD-HD-NI-NG-NG	Tal BX1
MR-58BC	BC	NI-HD-NG-NN-NG-NI	
MR-58CR	CR	NI-NI-NI-N*-NS-NG	
MR-59LA	LA	NN-NN-HD-NH-NN-NG	
MR-59AB	AB	NS-NG-HD-NI-NG-HD	Tal AT1
MR-59BRa	BR	NH-NG-NG-NG-HD-NG	
MR-59BRb	BR	NH-NG-NG-NG-NS-NG	
MR-60LA	LA	NI-N*-NI-NS-NN-NG	
MR-60AB	AB	NN-HD-HD-HD-NG-HD	Tal CA1
MR-60BR	BR	NS-HD-N*-NS-NG	
MR-61LA	LA	HD-HD-NN-NN-NS-NG	
MR-61AB	AB	HD-S*-HG-HD-NG-N*	Tal AQ3
MR-61BC	BC	HD-HD-HD-N*-NN-NI (long!)	
MR-61CD	CD	NN-HD-HI-ND-HD-HG	
MR-61DR	DR	NN-HG-N*	
MR-62LA	LA	NI-NN-N*-NG-NS-NN	
MR-62AB	AB	NN-NN-NI-NN-NI-N*	Tal AO3
MR-62BR	BR	HD-HD-NI-NG-NG	
MR-63LA	LA	HD-HD-HD-NG-N*-NN	
MR-63AB	AB	HD-HD-N*-NI-NI-NN	Tal AP3
MR-63BC	BC	HD-HI-ND-HD-NI-HD	
MR-63CR	CR	NG-NG	

Tabelle 5.1 Übersicht über die erstellten Hexa-repeat-Module für die artifiziellen TALEs in Kapitel 3.3.5.4.

:: Lebenslauf

:: Persönliche Daten SS

Maik Reschke
An der Küchenbreite 10
06311 Helbra
0172 / 1390947
maik.reschke@icloud.com
* 03.07.1988 in Lutherstadt Eisleben
verheiratet, keine Kinder

:: Promotion

- 2015 – 2018** Fortsetzung der Promotionsarbeit
Leibniz Universität Hannover
Arbeitsgruppe Pflanzenbiotechnologie unter Prof. Dr. Jens Boch
Funktionelle Analyse von TALEs in *Xanthomonas oryzae* und
Entwicklung von TALENs zum Genome Editing
- 04/2014** Auslandsaufenthalt, CIRAD Agricultural Research for
Development, Montpellier, Frankreich
COST- *Short-term scientific mission* Stipendium
- 2012 – 2015** Promotionsarbeit
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abteilung Pflanzengenetik unter Prof. Dr. Ulla Bonas
Arbeitsgruppe Pflanzenbiotechnologie unter Prof. Dr. Jens Boch
Funktionelle Analyse von TALEs in *Xanthomonas oryzae* und
Entwicklung von TALENs zum Genome Editing
- 2010 – 2012** Masterstudium: Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
Masterarbeit: „Gerichtete Genommodifikation in Modellpflanzen“
- 2007 – 2010** Bachelorstudium Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
Bachelorarbeit: „Konstruktion künstlicher TAL-Effektoren“

:: Schulische Ausbildung

- 2006 – 2007** Martin-Luther-Gymnasium Eisleben (Abitur-Note: 2,2)
- 2000 – 2006** Gottfried-August-Bürger Gymnasium Benndorf
- 1998 – 2000** Gustav-Heinemann-Sekundarschule Ahlsdorf
- 1994 – 1998** Grundschule Ahlsdorf

:: Publikationen

Erkes A, **Reschke M**, Boch J, Grau J. 2017. Evolution of Transcription Activator-Like Effectors in *Xanthomonas oryzae*. *Genome Biology and Evolution* **9**: 1599–1615.

Blanvillain-Baufumé S, **Reschke M**, Solé M, Auguy F, Doucoure H, Szurek B, Meynard D, Portefaix M, Cunnac S, Guiderdoni E, *et al.* 2016. Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors. *Plant biotechnology journal* **15**: 306–317.

Ordon J, Gantner J, Kemna J, Schwalgun L, **Reschke M**, Streubel J, Boch J, Stüttmann J. 2016. Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **89**: 155–168.

Grau J, **Reschke M**, Erkes A, Streubel J, Morgan RD, Wilson GG, Koebnik R, Boch J. 2016. AnnoTALE: bioinformatics tools for identification, annotation, and nomenclature of TALEs from *Xanthomonas* genomic sequences. *Scientific Reports* **6**: 21077.

Richter A, Streubel J, Blücher C, Szurek B, **Reschke M**, Grau J, Boch J. 2014. A TAL effector repeat architecture for frameshift binding. *Nature communications* **5**: 3447.

Grau J, Wolf A, **Reschke M**, Bonas U, Posch S, Boch J. 2013. Computational Predictions Provide Insights into the Biology of TAL Effector Target Sites (A Tresch, Ed.). *PLoS Computational Biology* **9**: e1002962.

Streubel J, Richter A, **Reschke M**, Boch J (2013). TALEs - Proteine mit programmierbarer DNA-Bindesepezifität. *BIOSpektrum*. 19, 370-372.