

**Entwicklung des modularen CasCADE-Vektorsystems
und dessen Verwendung zur gezielten Mutagenese
der *Stp13*-Orthologe von Weizen und Gerste
für die Etablierung dauerhafter Resistenz
gegen Rost- und Mehltaupilze**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Iris Valerie Olga Hoffie, geb. Koepfel, M. Sc.

2023

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

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

Tag der Promotion: 12.12.2022

Zusammenfassung

Schlagworte: *Genomeditierung, Rostresistenz, Stp13*

Programmierbare Endonukleasen sind wirksame Werkzeuge für die Pflanzenforschung und Biotechnologie-gestützte Pflanzenzüchtung. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte modulare Vektorsystem CasCADE erlaubt einen schnellen und einfachen Zusammenbau von komplexen Vektoren für die Expression von RNA-geleiteten, *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated (Cas)* - Endonukleasen zur Genomeditierung mono- und dikotyler Pflanzenarten. Es besteht die Möglichkeit, bis zu vier verschiedene gRNA-codierende Expressionseinheiten in einem Vektor zusammenzustellen. Bezüglich der Expressionseinheit für die Cas-Endonuklease umfasst das Vektorsystem eine Vielzahl frei kombinierbarer Modulvarianten für Promotoren, codierende Sequenzen diverser *cas9*-Derivate, translationale Fusionselemente, Terminatoren und variabel besetzbare Positionen. Die unterschiedlichen Module einschließlich einiger bereits vorliegender Endonuklease-Expressionseinheiten lassen sich in insgesamt drei *Golden-Gate*-Klonierungsschritten zu vollständigen gRNA/*cas9*-Expressionsvektoren kombinieren, die für den direkten DNA-Transfer in Pflanzenzellen genutzt werden können. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, alle funktionellen Elemente solcher Plasmide in einem Schritt in kompatible generische Binärvektoren mit unterschiedlichen Selektionsmarkergenen für die Agrobakterien-vermittelte Pflanzentransformation zu übertragen. Anhand der gezielten Mutagenese der *Sugar transport protein 13 (Stp13)* -Orthologe von Weizen und Gerste wurde das CasCADE-System exemplarisch validiert. Grundlage dafür ist das vom Weizen bekannte, Resistenz-vermittelnde *Lr67res*-Allel dieses Zuckertransporters, das trotz seiner universellen und stabilen Wirksamkeit gegen Schwarz-, Braun- und Gelbrost sowie Mehltau aufgrund der genetischen Kopplung mit dem *Reduced height 1* Wildtyp-Allel für die Züchtung moderner, kurzstrohiger Sorten bislang nicht erschlossen werden konnte. Unter Verwendung des CasCADE-Systems wurde eine breite Palette neuer allelischer Varianten in Weizen und Gerste erzeugt, die prinzipiell auf die gleiche Weise wie *Lr67res* Resistenz verleihen könnten. In vorläufigen Tests erwiesen sich einige der generierten Gerstenmutanten als resistent gegen den Braunrostpilz. Die im Rahmen der vorliegenden Studie erzeugten Gersten- und Weizenmutanten stellen eine aussichtsreiche Grundlage für die Erforschung des Lr67-Resistenzmechanismus und die Entwicklung pilzresistenter Sorten dar.

Abstract

Keywords: *Genome editing, rust resistance, Stp13*

Programmable endonucleases are effective tools for plant research and biotechnology-assisted plant breeding. Given the rapid advancement of genome editing and the ever-increasing diversity of functional elements available for it, the laborious generation of transformation vectors is a crucial limitation. The modular vector system CasCADE developed in the present work facilitates the rapid and simple assembly of complex vectors for the expression of RNA-guided, Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated (Cas) endonucleases for genome editing of mono- and dicotyledonous plant species. Different RNA polymerase III promoters are available for gRNA expression and it is possible to assemble up to four different gRNA-coding expression units in one vector. With regard to the expression unit for the Cas endonuclease, the vector system comprises a large number of freely combinable module variants for promoters, coding sequences of various *cas9* derivatives, translational fusion elements and terminators. In addition, a completely variable position is provided for any separate element, such as the expression unit for a fluorescent protein. The different modules including some already existing endonuclease expression units can be combined in a total of three Golden Gate cloning steps to form complete gRNA/*cas9* expression vectors that can be used for direct DNA transfer into plant cells. Furthermore, it is possible to transfer all functional elements of such plasmids in one step into compatible generic binary vectors with different selection marker genes for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. The CasCADE system was validated exemplarily by targeted mutagenesis of the *Sugar transport protein 13* (*Stp13*) orthologs of barley and wheat. This approach relied on the resistance-conferring *Lr67res* allele of the STP13 sugar transporter known from wheat, which, despite its universal and stable efficacy against leaf, stem and stripe rust as well as powdery mildew, has not yet been exploited for breeding of modern, short-straw varieties due to genetic linkage with the *Reduced height 1* wild-type allele. Using the CasCADE system, a wide range of new *Stp13* allelic variants were generated in wheat and barley that could in principle confer resistance in the same way as *Lr67res*. In preliminary tests, some of the generated barley mutants were found indeed to be resistant to the leaf rust fungus. The barley and wheat mutants generated in the present study provide a promising basis for research on the *Lr67* resistance mechanism and the development of varieties with broad and durable resistance to fungal diseases.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Genomeditierung	2
1.1.1. RNA-geleitete Endonukleasen.....	4
1.2. DNA-Reparaturmechanismen.....	7
1.2.1. Präzise Genomeditierung	10
1.3. Modulare Vektorsysteme.....	10
1.3.1. Golden-Gate-Klonierung	13
1.4. Mehltau und Rostpilze sind wichtige Schaderreger bei Weizen und Gerste.....	13
1.4.1. Getreideroste	14
1.4.1.1. Braunrost	16
1.4.1.2. Gelbrost.....	17
1.4.1.3. Schwarzrost.....	17
1.4.2. Mehltau	18
1.4.3. Haustorien - die speziellen Ernährungsorgane.....	19
1.5. Resistenzgene.....	21
1.6. <i>Lr67</i> -basierte Resistenz in Weizen und Gerste	23
1.7. Zuckertransport und STP13-Funktion in Pflanzen.....	26
1.8. Zielstellungen dieser Arbeit	29
2. Material und Methoden	30
2.1. Materialien.....	30
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	30
2.1.2. Enzyme.....	30
2.1.3. Oligonukleotide.....	30
2.1.4. Reaktionskits	30
2.1.5. Größenstandard	31

2.1.6.	Pflanzenmaterial	31
2.1.7.	Bakterien	31
2.1.8.	Antibiotika	32
2.1.9.	Medien und Puffer	32
2.1.9.1.	Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	32
2.1.9.2.	Medien für die Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i>	32
2.1.9.3.	Medien für die Transformation und Regeneration von Gerste.....	33
2.1.9.4.	Medien für die Transformation und Regeneration von Weizen.....	33
2.1.9.5.	Puffer für die <i>Calcofluor White</i> -Färbung.....	34
2.1.9.6.	Puffer für die elektrophoretische Auftrennung von DNA	34
2.1.9.7.	Puffer für die Extraktion von genomischer DNA	35
2.1.10.	Verwendete und erstellte Vektoren.....	35
2.1.10.1.	CasCADE-Vektoren.....	35
2.1.10.2.	Vektoren zur gezielten Mutagenese von <i>HvLox1</i> , <i>TaLr67</i> und <i>HvStp13</i>	39
2.1.10.3.	Zielvektoren	39
2.1.10.4.	mCherry-Vektor.....	40
2.1.10.5.	Binärvektoren	40
2.1.11.	Software.....	40
2.1.12.	Terminologie.....	40
2.2.	Methoden.....	41
2.2.1.	Extraktion genomischer DNA	41
2.2.2.	Extraktion von Plasmid-DNA	41
2.2.3.	Polymerase-Kettenreaktion	41
2.2.4.	DNA-Gelelektrophorese	42
2.2.5.	Aufreinigung von Nukleinsäuren aus PCR-Reaktionen und Agarosegelen	42
2.2.6.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	42
2.2.7.	<i>Gibson Assembly</i>	43
2.2.8.	Restriktionsverdau.....	43
2.2.9.	Ligation	43

2.2.10.	<i>Golden-Gate</i> -Klonierung	43
2.2.11.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	44
2.2.12.	Transformation elektrokompeterer <i>A. tumefaciens</i> -Zellen.....	44
2.2.13.	Blau-Weiß-Selektion.....	44
2.2.14.	Kolonie-PCR	45
2.2.15.	Sequenzierung.....	45
2.2.15.1.	Sanger-Sequenzierung.....	45
2.2.15.2.	Amplikon-Tiefensequenzierung	45
2.2.16.	CasCADE Klonierungsprotokoll	46
2.2.16.1.	Klonierung von gRNA-Modulvektoren.....	46
2.2.16.2.	Assemblierung der gRNA-Module.....	46
2.2.16.3.	Assemblierung der Promotor-, Endonuklease- und Terminator-Module.....	46
2.2.16.4.	Finale Assemblierung.....	47
2.2.17.	Auswahl der Zielmotive	47
2.2.18.	Validierung der gRNA-Aktivität durch biolistischen DNA-Transfer in Blattepidermis-Zellen.....	48
2.2.19.	Validierung der gRNA-Aktivität durch Protoplastentransformation.....	49
2.2.20.	Pflanzenkultivierung und Transformation	49
2.2.20.1.	Biolistische Weizentransformation.....	50
2.2.20.2.	Agrobakterien-vermittelte Weizentransformation	51
2.2.20.3.	Agrobakterien-vermittelte Gerstentransformation	52
2.2.21.	Nachweis von Transfer-DNA mittels PCR.....	52
2.2.22.	Resistenztests	52
2.2.23.	<i>Calcofluor White</i> -Färbung und Mikroskopie.....	53
3.	Ergebnisse	55
3.1.	CasCADE - ein modulares und variables Vektorsystem.....	55
3.1.1.	Schritt 1: Der Zusammenbau einer individuellen gRNA-Expressionseinheit.....	55
3.1.2.	Schritt 2: Der Zusammenbau einer Endonuklease-Expressionseinheit.....	57
3.1.3.	Schritt 3: Die finale Assemblierung zu einer funktionellen Expressionseinheit.....	59

3.1.4.	Validierung des modularen Vektorsystems.....	61
3.2.	Gezielte Mutagenese von <i>Lr67</i> des Weizens.....	65
3.2.1.	Gezielte Mutagenese von einzelnen Zielmotiven mit gRNA/cas9- Standardvektoren	68
3.2.2.	Simultane Mutagenese von mehreren Zielmotiven mit Vektoren des CasCADE- Systems.....	73
3.3.	Das <i>Lr67</i> -Ortholog der Gerste	88
3.3.1.	Gezielte Mutagenese von <i>Stp13</i> der Gerste.....	88
3.3.2.	Resistenztests anhand der Entwicklung von <i>Puccinia hordei</i> im adulten Pflanzenstadium	95
3.3.3.	Resistenztests anhand der Entwicklung von Braunrost im juvenilen Pflanzenstadium	100
3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	104
4.	Diskussion	105
4.1.	Etablierung des CasCADE-Systems.....	105
4.2.	Vergleich von modularen Vektorsystemen.....	106
4.3.	Etablierung einer <i>Lr67</i> -basierten Resistenz.....	113
4.3.1.	Erzeugung von <i>Lr67</i> -Mutanten im Weizen	114
4.3.2.	Erzeugung von <i>Stp13</i> -Mutanten in der Gerste	118
4.4.	<i>Lr67</i> -vermittelter Resistenzmechanismus.....	120
4.4.1.	Beteiligung von <i>Stp13</i> an der PAMP-vermittelten Immunität.....	121
4.4.2.	Die dominant-negative Interferenz-Hypothese	123
4.4.3.	Die Zuckersignal-Hypothese	124
4.4.4.	<i>Gain-of-function</i> -Hypothese	125
4.4.5.	Hypothetisches Resistenzmodell	125
4.5.	Relevanz von <i>Lr67/ Stp13</i> für die Pflanzenzüchtung.....	128
4.6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	129
5.	Literaturverzeichnis	132
6.	Anhang	148

Danksagung.....	152
Lebenslauf.....	153

Abkürzungsverzeichnis

% w/v	Massenprozent	ETI	Effektor-vermittelte Immunität (<i>Effector-triggered immunity</i>)
% v/v	Volumenprozent	FLS2	<i>FLAGELLIN-SENSING 2</i> (FLS2) Rezeptor-Kinase
∞	Unendlichzeichen	Fn	<i>Francisella novicida</i>
μ	Mikro	FokI	TypII Restriktionsenzym aus <i>Flavobacterium okeanoikoites</i>
ABA	Abscisinsäure (<i>Abscisic acid</i>)	Gbp	Giga-Basenpaare
ABREs	<i>ABA-responsive elements</i>	GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>Green fluorescent protein</i>)
ADA	Adenin-Deaminase	gRNA	<i>guide</i> RNA
<i>ampR</i>	Ampicillin-Resistenzgen	h	Stunde (<i>hour</i>)
APR	<i>Adult plant resistance</i>	HMZ	Haustorienmutterzellen
<i>A. thaliana</i> ,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>hpt</i>	<i>Hygromycin-Phosphotransferase</i> - Gen
At		Hv	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>A.</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	inkl.	inklusive
<i>tumefaciens</i>		IPTG	Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid
BAK1	<i>BRASSINOSTEROID INSENSITIVE</i> <i>1</i> -assoziierte Rezeptor-Kinase 1	kb	Kilobasenpaare
BAP	6-Benzylaminopurin	<i>lacZ</i>	ein Gen aus dem <i>E. coli</i> Lactose- Operon, codiert für β- Galactosidase
BER	Basen-Exzisionsreparatur (<i>Base</i> <i>excision repair</i>)	LB	linke Erkennungssequenz der T- DNA (<i>Left Border</i>)
BiFC	Bimolekulares Fluoreszenz- Komplementations-Assay (<i>Bimolecular fluorescence</i> <i>complementation assay</i>)	Lb	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search</i> <i>Tool</i>	LeB4	Legumin B4-Signalpeptid
bp	Basenpaar(e)	<i>Lox</i>	Lipoxygenase Gen
bzw.	beziehungsweise	<i>Lr(67)</i>	<i>Leaf rust resistance gene (67)</i>
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>)	<i>Ltn3</i>	<i>Leaf tip necrosis associated gene</i> <i>3</i>
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein	M ₁ , M ₂ , M ₃ ,	Mutierte Filialgenerationen 1, 2,
ccdB	<i>control of cell death B</i>	M ₄	3, 4
CDA	Cytidin-Deaminase	M	Molar
CRE	Cis-regulatorische Elemente	MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>Multiple cloning site</i>)
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced</i> <i>short palindromic repeats</i>	MFS	Major-Facilitator-Superfamilie
crRNA	CRISPR-RNA	MMEJ	Mikrohomologie-basierte Endverknüpfung (<i>Microhomology-mediated end</i> <i>joining</i>)
Csy4	CRISPR-assoziierte RNA- Endoribonuklease	min	Minute
d	Tage (<i>Days</i>)	mM	Millimolar
dCas	<i>dead</i> Cas	MMR	Mismatch-Reparatur (<i>Mismatch</i> <i>repair</i>)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	MS	Murashige und Skoog
d.h.	das heißt	MT	Mutante
DMSO	Dimethylsulfoxid	NaAc	Natriumacetat
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate		
dpi	Tage nach der Infektion (<i>days</i> <i>post infection</i>)		
DSB	DNA-Doppelstrangbruch		
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		

NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur (<i>Nucleotide excision repair</i>)	Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (<i>Non-homologous end-joining</i>)	SDS	Natriumlaurylsulfat
NLR	Nukleotid-bindende Leucin- reiche Repeat-Gene (<i>Nucleotide- binding domain leucine-rich repeat containing genes</i>)	SDSA	Synthese-abhängige Strang- Annealing (<i>Synthesis-dependent strand annealing, SDSA</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>Nuclear localization signal</i>)	SNP	Einzelbasenaustausch (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
<i>nos-t</i>	<i>nopaline synthase</i> Terminator	<i>specR</i>	Spektinomycin-Resistenzgen
oriC	chromosomaler Replikationsursprung für Bakterien (<i>Origin of chromosomal replication</i>)	<i>S. pyogenes, Sp</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Os	<i>Oryza sativa</i>	<i>Sr55</i>	<i>Stem rust resistance gene 55</i>
PAM	<i>Protospacer-adjacent motif</i>	SSA	Einzelstrang-Annealing (<i>Single- strand annealing</i>)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)	SSB	Einzelstrangbrüche (<i>Single- strand breaks</i>)
Pc	<i>Petroselinum crispum</i>	STP (13)	<i>Sugar Transport Protein (13)</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)	sus	anfällig (<i>susceptible</i>)
PEG	Polyethylenglykol	SUT	<i>Sucrose Transporter</i>
pegRNA	<i>prime editing guide RNA</i>	SWEET	<i>Sugars Will Eventually be Exported Transporter</i>
<i>Pm46</i>	<i>Powdery mildew resistance gene 46</i>	T ₀	primär Transgene
PR	Pathogenese-assoziiert (<i>Pathogenesis-related</i>)	T _{1, T₂}	transgene Filialgeneration 1, 2
psi	<i>pound per square inch</i>	Ta	<i>Triticum aestivum</i>
PTI	PAMP-vermittelte Immunität (<i>PAMP-triggered immunity</i>)	TALEN(s)	<i>Transcription activator-like effector-Nuklease(n)</i>
qRT-PCR	<i>Real-time quantitative reverse transcription PCR</i>	TD	Transmembrandomäne
RB	rechte Erkennungssequenz der T- DNA (<i>Right Border</i>)	T-DNA	Transfer DNA
res	resistent (<i>resistant</i>)	tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
RGS1	G-Protein-gekoppelten Rezeptor RGS1 (<i>Regulator of G-protein signalling protein 1</i>)	u.a.	unter anderem
<i>Rht1</i>	<i>Reduced Height 1</i>	Ubi	<i>Ubiquitin</i> -Promotor
RNA	Ribonukleinsäure	UGI	Uracil-DNA Glycosylase Inhibitor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive oxygen species</i>)	UTR	untranslatierte Region
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotation per minute</i>)	V	Volt
RT	Raumtemperatur	VIGS	<i>Virus-induced gene silencing</i>
RVD	<i>Repeat Variable Diresidue</i>	WT	Wildtyp
s	Sekunde	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-d- galaktosid
s.	siehe	<i>yfp; YFP</i>	gelb fluoreszierendes Protein (<i>Yellow fluorescent protein</i>)
		<i>Yr46</i>	<i>Yellow rust resistance gene 46</i>
		ZFN(s)	Zinkfinger-Nuklease(n)
		ZM	Zielmotiv
		Zm	<i>Zea mays</i>
		z.B.	zum Beispiel
		z.T.	zum Teil
		2x35S	doppelt-verstärkter Blumenkohlsaikvirus 35S- Promotor
		35S-t	Blumenkohlsaikvirus 35S- Terminator

1. Einleitung

Seit etwa 10.000 Jahren werden Pflanzen von Menschen als Nahrung, als Quelle für Rohstoffe und auch zur Energiegewinnung kultiviert. Dabei sind genetische Veränderungen schon immer die Grundlage von Vielfalt und Fortentwicklung gewesen, gleichsam im Kontext der Evolution wie auch bei der Selektion durch den Menschen. In den Anfängen erfolgte die Selektion durch den Menschen jedoch nur anhand phänotypischer Merkmale, die auf genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen beruhen. So entstanden aus Wildpflanzen domestizierte Kulturpflanzen, die später mittels immer gezielterer Züchtung weiter an die Bedürfnisse des Menschen angepasst wurden. Insbesondere die stark wachsende Weltbevölkerung stellt die Landwirtschaft vor die große Herausforderung, dass die Nahrungsproduktion weiter gesteigert werden muss, auf der anderen Seite aber die zur Verfügung stehenden nutzbaren Flächen rückläufig sind und nur noch durch schwerwiegende Eingriffe in natürliche Ökosysteme erweitert werden könnten (Davies et al., 2009; Ronald, 2011; IPBES, 2019). Die Nahrungsproduktion muss also vor allem effizienter auf den vorhandenen Flächen werden. Doch nicht nur die wachsende Weltbevölkerung ist eine Herausforderung, sondern auch der Klimawandel. Es werden extremere Wetterphasen mit Hitze, Dürre und Überflutung erwartet (IPCC, 2018; Modrzejewski et al., 2018; IPCC, 2021). Ernteausfälle durch biotische oder abiotische Faktoren, können zu erheblichen Problemen in der Nahrungsmittelversorgung führen. Um diese sicher zu stellen, müssen die Pflanzen besser an sich schnell verändernde Umweltbedingungen angepasst sein (Parry et al., 2009; Reynolds et al., 2009). Zudem steigen auch die Ansprüche der modernen Gesellschaft: Die Lebensmittel sollen qualitativ besser, gesünder und vielfältiger sein. Zugleich soll der Einsatz von Dünger und Pflanzenschutzmitteln reduziert werden und die Landwirtschaft insgesamt nachhaltiger, also mit weniger externen Inputs und weniger Ressourcenverbrauch, produzieren (Ronald, 2011). Es werden also besser angepasste Pflanzen benötigt, die mindestens genauso viel Ertrag wie die bisher angebauten Sorten bringen und/oder noch resistent gegen möglichst viele Schädlinge sind.

Mit den konventionellen Züchtungsmethoden, wie z.B. der induzierten Mutagenese durch ionisierende Strahlung oder Chemikalien, ist es aufgrund der Vielzahl gleichzeitig und an zufälligen Stellen erfolgreicher genetischer Veränderungen schwierig, ausschließlich gewünschte Eigenschaften hervorzurufen. Zudem ist der danach notwendige Züchtungsprozess sehr zeit- und arbeitsintensiv, denn zumeist entstehen Pflanzen mit

vielen ungewollten, zusätzlichen Mutationen, die nur über mehrere Rückkreuzungsschritte und Selektion reduziert werden können (Wang et al., 2012). Der Einsatz von den neuen Züchtungstechniken kann dagegen den Züchtungsprozess präzisieren und erheblich beschleunigen. Zu dem Werkzeugkasten der neuen Züchtungstechniken gehört die Genomeditierung mittels programmierbarer Endonukleasen.

1.1. Genomeditierung

Mit dem Einsatz von programmierbaren Endonukleasen ist es möglich DNA-Sequenzen präzise in einem Organismus zu verändern. Das Besondere an den Nuklease-basierten Methoden ist, dass die zu erzielenden genetischen Veränderungen an vorher definierten Stellen im Genom erfolgen. Die Standardanwendung ist die gezielte Mutagenese, bei der der Ort der Mutation präzise bestimmt werden kann, die entstehende Basensequenz aber weitgehend zufällig ist (Jinek et al., 2012).

In der pflanzlichen Forschung und Biotechnologie wurden bisher vier Klassen programmierbarer Endonukleasen verwendet: Meganukleasen, Zinkfingernukleasen (ZFN), *Transcription activator-like effector*-Nukleasen (TALENs) und die RNA-geleiteten Endonukleasen aus dem bakteriellen CRISPR/Cas-System (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)-assoziierte Endonukleasen (Cas)).

Meganukleasen sind natürlich vorkommende Endodeoxyribonukleasen die lange (>12 Basenpaare) DNA-Sequenzen erkennen (Abbildung 1A). Die am häufigsten verwendete Meganuklease ist die I-SceI Endonuklease aus *Saccharomyces cerevisiae* (Plessis et al., 1992; Pauwels et al. 2014). Meganukleasen sind sehr spezifisch und effizient, es ist allerdings schwierig sie zu modifizieren, um andere als ihre nativen Zielsequenzen ansteuern zu können (Gao et al., 2010). Dies schränkt den Gebrauch im Vergleich zu den nachfolgend genannten Endonukleasen ein (Puchta und Fauser, 2014; Kouranova et al., 2016).

Zinkfingernukleasen sind Hybridproteine mit einer DNA-Erkennungsdomäne, bestehend aus mindestens drei Zinkfingern, und einer FokI-Restriktionsendonukleasedomäne (Kim et al., 1996). FokI-Endonukleasen sind Typ-IIS-Restriktionsenzyme aus *Flavobacterium okeanokoites* und Zinkfinger sind eine Klasse von DNA-bindenden Proteinen, die ein Zink(II)-Ion binden und dadurch die charakteristische strukturelle Domäne bilden, die als Zinkfinger bezeichnet wird (Kim et al., 1996). Jeder Zinkfinger interagiert mit drei Basenpaaren (bp) und aufeinanderfolgende Zinkfinger können so kombiniert werden,

dass pro Monomer neun bis 12 bp lange DNA Sequenzen erkannt und gebunden werden können (Abbildung 1B; Voytas 2013; Puchta und Fauser, 2014). Die modulare Struktur der Zinkfinger erleichtert deren Programmierung und fusioniert mit der FokI-Endonukleasedomäne entsteht ein sequenzspezifisches Restriktionsenzym. Jedoch müssen ZFN immer paarweise und entgegengesetzt orientiert verwendet werden, da deren FokI-Endonukleasedomäne nur dann katalytisch aktiv ist, wenn sie als Dimer vorliegt (Kim et al., 1996). Der Herstellungsprozess von ZFN ist besonders aufwendig und zudem gibt es Limitationen bei der Auswahl möglicher Bindestellen, sowie z.T. schwer vorhersehbare Einflüsse auf die DNA-Bindesepezifität durch gemeinsam verwendete Zinkfinger (Puchta und Fauser, 2014). Deswegen wurden Zinkfingernukleasen relativ schnell durch die leichter verwendbaren nachfolgenden Systeme abgelöst.

TALENs agieren ähnlich wie die ZFNs als Dimere (Abbildung 1C; Christian et al., 2010). *Transcription activator-like* (TAL) -Effektoren (TALE) stammen von pflanzenpathogenen Bakterien der Gattung *Xanthomonas* und agieren als Transkriptionsaktivatoren in den Pflanzenzellen indem sie direkt an Promotoren binden (Boch et al., 2009). Die DNA-Bindedomänen bestehen aus bis zu 30 Kopien von hoch konservierten Wiederholungen (*Repeats*) aus zumeist 34 Aminosäuren. Lediglich die Positionen 12 und 13 (*Repeat Variable Diresidue*, RVD) eines jeden *Repeats* sind nicht einheitlich, denn sie spezifizieren die unterschiedlichen zu bindenden DNA-Basenpaare (Boch et al., 2009). Eine an so eine TALE-Bindedomäne gebundene FokI-Endonuklease induziert - wie bei den Zinkfingernukleasen - die DNA-Doppelstrangbrüche in der Zielsequenz (Christian et al., 2010). Da jeder *Repeat* eine Base erkennt, ist die Gestaltung und Assemblierung der Erkennungssequenz einfacher und flexibler als bei Zinkfingernukleasen (Boch et al., 2009).

Wenige Jahre nach den TALENs wurden aus bakteriellen CRISPR/Cas-Systemen heraus Endonukleasen für die Verwendung in der Biotechnologie entdeckt, die mittlerweile die größte Verbreitung gefunden haben und auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden.

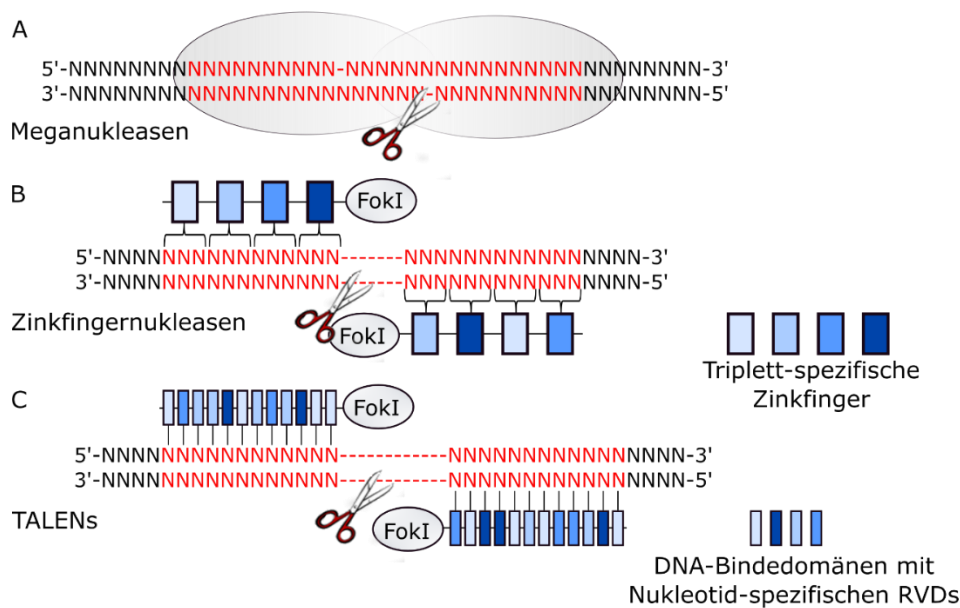


Abbildung 1: Programmierbare Endonukleasen (A) Meganukleasen binden an spezifische DNA-Sequenzen und induzieren dort Doppelstrangbrüche. Sie funktionieren ähnlich wie Restriktionsenzyme, nur, dass die Erkennungssequenzen länger sind. Die Bindedomäne mancher Meganukleasen (z.B. die in Dimeren funktionierende I-CreI) kann so modifiziert werden, dass sie andere als die ursprünglichen Zielsequenzen erkennt. (B) Zinkfingernukleasen funktionieren als Dimere. Die katalytisch aktive Domäne FokI ist mit einer Serie von Zinkfingern verbunden, von denen jeder ein spezifisches Basen-Triplett erkennt. (C) TALENs funktionieren ähnlich wie ZFNs als Dimere. Die DNA-Bindedomäne besteht aus sich wiederholenden Modulen, die jeweils für ein einzelnes Nukleotid spezifisch sind (*Repeat Variable Di-residues*, RVDs). Abbildung angelehnt an Bertoni, 2014

1.1.1. RNA-geleitete Endonukleasen

Die heutzutage vorrangig verwendeten Werkzeuge zur Genomeditierung sind die auf dem CRISPR/Cas9-System basierenden RNA-geleiteten Cas-Endonukleasen. Dieses System ist abgeleitet von einem adaptiven Immunsystem aus Mikroorganismen, durch das Nukleinsäuren von Bakteriophagen in der Bakterienzelle erkannt und abgebaut werden (zusammengefasst in Terns und Terns, 2011).

RNA-geleitete Endonukleasen aus diesem System haben vielfältige Anwendung in der Genomeditierung gefunden. Am häufigsten wird dabei die Cas9-Endonuklease von *Streptococcus pyogenes* (Sp) genutzt. Im ursprünglichen CRISPR/Cas9-System werden zwei RNA-Strukturen benötigt: die CRISPR-RNA (crRNA) ist komplementär zur Zielsequenz und die *trans-activating* crRNA (tracrRNA) bindet an die crRNA und an das Cas9-Enzym (Jinek et al., 2012). Gemeinsam leiten sie die Cas9 zu der Zielsequenz. Das heutzutage verwendete Zwei-Komponenten-System besteht aus der Cas9-Endonuklease und einer artifiziellen (*single*) *guide*-RNA (gRNA), welche aus einer miteinander verbundenen crRNA und tracrRNA-Sequenz besteht und die Cas9 zu einer spezifischen

DNA-Sequenz navigiert (Jinek et al., 2012). Die gRNA besteht aus einem strukturellen und einem variablen Teil. Der strukturelle 76 Basenpaar lange 3'-Teil bildet eine Raumstruktur, die für die Bindung der RNA mit dem Cas9-Protein zum Ribonukleoproteinkomplex erforderlich ist. Der am 5'-Ende gelegene variable Teil der gRNA hat eine Länge von zumeist 20 Nukleotiden und definiert die DNA-Bindenspezifität der gRNA und damit des gesamten Ribonukleoproteinkomplexes nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung am Zielmotiv, das dem bakteriellen Protospacer entspricht (Jinek et al., 2012). Das Zielmotiv wird darüber hinaus durch das *Protospacer-adjacent motif* (PAM) ergänzt, welches vom Cas9-Protein erkannt und gebunden wird. Im Falle der SpCas9 ist das PAM zum Beispiel eine Abfolge von einem beliebigen Nukleotid und zwei Guanin-Nukleotiden (NGG; Jinek et al., 2012). Sobald der gRNA/Cas9-Komplex ein solches Motiv erkannt hat, wird das Zielmotiv mit dem variablen Teil der gRNA verglichen (Abbildung 2). Kann die gRNA an das Zielmotiv binden, werden die zwei endonukleolytischen Domänen (RuvC und HNH) des Cas-Enzyms aktiviert und induzieren einen Doppelstrangbruch (*Double-strand break*, DSB). Die HNH-Domäne schneidet den komplementären Strang nach der dritten Base strangaufwärts von dem PAM und die RuvC-Domäne schneidet den nicht-komplementären Strang an einer Position zwischen dem dritten und achten Nukleotid strangaufwärts des PAMs (Jinek et al., 2012). Häufig wird eine 1 bp-Deletion induziert, die durch einen Doppelstrangbruch zwischen dem dritten und vierten Nukleotid strangaufwärts von dem PAM entsteht.

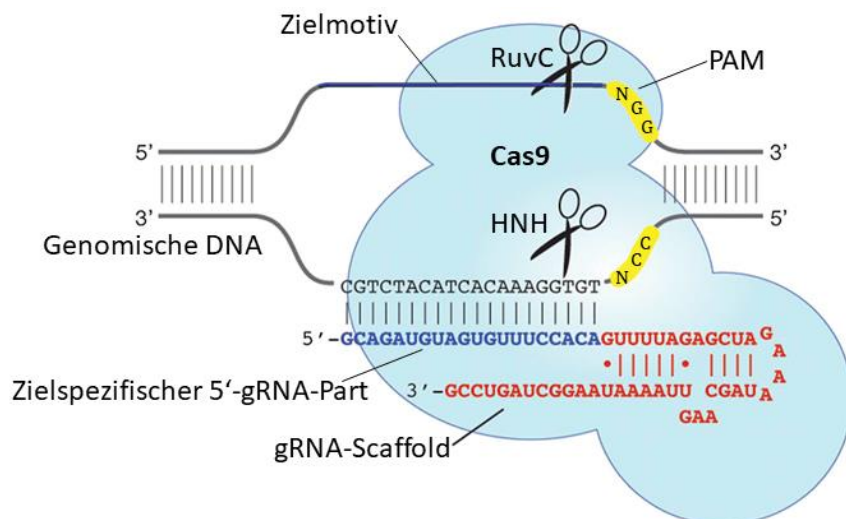


Abbildung 2: Der gRNA/Cas9-Komplex Die gRNA besteht aus einem 20 Nucleotide langen 5'-terminalen Teil (blau), der komplementär zu dem Zielmotiv in der genomischen DNA ist und einer 76 Nucleotide langen *Stem-Loop*-Struktur (rot), die für die Cas9-Bindung erforderlich ist. Das Zielmotiv setzt sich aus der zur gRNA komplementären Sequenz im Genom und einem NGG-PAM (gelb) zusammen. Die DNA wird geschnitten, wenn der DNA-Strang geöffnet ist und die gRNA an das Zielmotiv bindet. Verändert nach Jinek et al., 2013

Die flexible Anpassung des Zielmotiv-spezifischen 5'-Endes der gRNA ermöglicht eine einfache Anwendung dieser Technik. Zudem ist die Anwendung auch in höheren Organismen effizient und zuverlässig (Zhang et al., 2012). Dies hat dazu geführt, dass diese Plattform mittlerweile das beliebteste und am häufigsten verwendete Werkzeug zur Genomeditierung ist (Doudna und Charpentier, 2014). Seit der Weiterentwicklung des CRISPR/Cas9-Systems hin zu einem biotechnologischen Werkzeug im Jahr 2012 wurden weitere Cas-Enzyme und Derivate entdeckt und erforscht. In Tabelle 1 werden einige der bis dato am häufigsten in pflanzenbiotechnologischen Anwendungen verwendeten Cas-Enzyme und Fusionsproteine aufgeführt. Die Anwendungsgebiete der Cas-Endonukleasen sind sehr vielfältig und es ist damit zu rechnen, dass in den nächsten Jahren weitere Cas-Enzyme entdeckt oder weiterentwickelt werden.

Tabelle 1: Häufig verwendete Cas-Endonukleasen und Fusionsproteine

Name	Herkunft	Eigenschaften	Referenz
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Induziert Doppelstrangbrüche an vorgegebener Position, NGG-PAM	Jinek et al., 2012
nCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Nickase; Induziert Einzelstrangbrüche an vorgegebener Position	Jinek et al., 2012
dCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Katalytisch inaktivierte Cas9, wird als Fusionsprotein mit Transkriptionsaktivatoren, Repressoren, Reportergenen oder DNA-modifizierenden Enzymen verwendet	Qi et al., 2013; Gilbert et al., 2013; Ishii et al., 2019; zusammengefasst in Anzalone et al., 2020
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	Induziert Doppelstrangbrüche an vorgegebener Position, NNGRRT-PAM	Ran et al., 2015
Cas12a	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> , <i>Acidaminococcus sp.</i> oder <i>Francisella novicida</i>	Induziert Doppelstrangbrüche an vorgegebener Position, T-reiche PAMs	Zetsche et al., 2015; Tang et al., 2017
xCas9	Artifiziell, basierend auf der SpCas9	Geringere Anforderungen an die PAM	Hu et al., 2018
SpCas9-NG	Artifiziell, basierend auf der SpCas9	Geringere Anforderungen an die PAM	Nishimasu et al., 2018
nCas9-CDA-UGI	nCas9 fusioniert mit einer Cytosin Deaminase (CDA) aus <i>Petromyzon marinus</i> oder <i>Rattus norvegicus</i> und einem Uracil-DNA Glycosylase Inhibitor (UGI) aus <i>Bacillus subtilis</i>	Gezielte Basen-Deaminierung; C,G > T,A	Nishida et al., 2016; Komor et al., 2016
EcTadA-nCas9	nCas9 fusioniert mit einer Adenosin Deaminase (ADA) aus <i>Escherichia coli</i>	Gezielte Basen-Deaminierung; A,T > G,C	Gaudelli et al., 2017; Li et al., 2018
nCas9-RT	nCas9 fusioniert mit einer Reversen Transkriptase aus dem <i>Murine leukemia virus</i>	Präzise Genomeditierung, Prime Editing	Anzalone et al., 2019

1.2. DNA-Reparaturmechanismen

Sowohl biologische Prozesse als auch Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel DNA-Replikation, Transkription oder UV-Strahlung können in Pflanzen zu DNA-Schäden führen (Britt, 2004; Spampinato, 2017; Manova und Gruzka, 2015). Es ist wichtig, dass entstandene Schäden unverzüglich repariert werden, um die Stabilität und die Integrität des Genoms zu erhalten (Waterworth et al., 2011). Für die diversen Arten an DNA-Schäden gibt es verschiedene zelleigene Reparaturmechanismen. Beschädigte Nukleotide (z.B. durch UV-Strahlung) werden über die Photoreaktivierung, die Basen-Exzisionsreparatur (*Base excision repair*, BER) und die Nukleotid-Exzisionsreparatur (*Nucleotide excision repair*, NER) repariert, während falsch eingefügte Nukleotide oder Basenfehlpaarungen durch die Mismatch-Reparaturwege (*Mismatch repair*, MMR) erkannt und korrigiert werden. Einzelstrangbrüche (*Single-strand breaks*, SSBs) können durch die Basen-Exzisionsreparatur oder Homologie-basierte Reparaturmechanismen behoben werden (zusammengefasst in Manova und Gruzka, 2015; Spampinato, 2017; Que et al., 2019). Doppelstrangbrüche werden vor allem durch die Endverknüpfungsbasierten oder Homologie-basierten Reparaturmechanismen repariert (Puchta und Fauser, 2014; zusammengefasst in Manova und Gruzka, 2015).

Cas-Endonukleasen erzeugen an vorgegebenen Stellen im Pflanzengenom Doppelstrangbrüche, die abhängig von der Zellproliferation, der Zellzyklusphase und der Initiierung von DNA-Endresektionen von unterschiedlichen Reparaturmechanismen repariert werden (Manova und Gruzka, 2015; Spampinato, 2017). In somatischen Pflanzenzellen werden Doppelstrangbrüche vorrangig über den Reparaturmechanismus der nicht-homologen Endverknüpfung (*Non-homologous end joining*, NHEJ) repariert (Puchta, 2005; Jinek et al., 2012). Bei diesem Reparaturmechanismus werden die beiden DNA-Enden durch die Bindung des Ku-Heterodimers vor Degradation geschützt. Die spezielle Ligase 4 verknüpft die beiden Enden dann wieder miteinander (Puchta und Fauser, 2014). Jedoch ist die nicht-homologe Endverknüpfung ein fehleranfälliger Reparaturmechanismus, der daher in gewisser Häufigkeit zu Insertionen oder Deletionen (Indels) in den adressierten Zielregionen führt (Abbildung 3A). Im Vergleich mit der NHEJ sind bei der Mikrohomologie-basierten Endverknüpfung (*Microhomology-mediated end joining*, MMEJ) andere Enzyme an der Reparatur des Doppelstrangbruchs beteiligt. Hier findet eine vom 3'-Ende ausgehende, durch eine Cyclin-abhängige Kinase (Cyclin-dependent kinase, CDK) geförderte, Resektion der DNA-Stränge statt (Puchta und Fauser, 2014; Que et al., 2019). Wichtig für den MMEJ-Reparaturmechanismus ist das

Vorhandensein von lokalen, kurzen (2-20 bp) Sequenzwiederholungen auf beiden durch den Doppelstrangbruch entstehenden Enden (Ata et al., 2018). Komplementäre Nukleotide (Mikrohomologien) auf den entstandenen 3'-Einzelsträngen finden zusammen und die DNA-Stränge werden an diesen Stellen religiert, was typischerweise zum Verlust eines der *Repeats* sowie der Nukleotide zwischen den beiden *Repeats* führt (Puchta und Fauser, 2014; Ata et al., 2018; Abbildung 3C).

Zu den Homologie-basierten Reparaturmechanismen gehört das Einzelstrang-*Annealing* (*Single-strand annealing, SSA*), das ähnlich wie das MMEJ funktioniert, nur dass unterschiedliche Enzyme beteiligt sind und die direkten Sequenzwiederholungen länger sind (können mehrere hundert Nukleotide umfassen). Am DSB entstehen ebenfalls durch Resektion 3'-Einzelstränge, die aufgrund der Komplementarität am Gegenstrang der Sequenzwiederholung binden und religiert werden. Die DNA Abschnitte zwischen diesen Sequenzwiederholungen und eine der Wiederholungen selbst gehen dabei verloren (Bhargava et al., 2016).

Das Synthese-abhängige Strang-*Annealing* (*Synthesis-dependent strand annealing, SDSA*) und die Doppelstrangbruch-Reparatur (*Double-strand break repair, DSBR*) gehören zu den Reparaturmechanismen der homologen Rekombination. Auch bei diesen Reparaturmechanismen entstehen am Doppelstrangbruch durch Resektion 3'-Einzelstränge. Bei beiden Reparaturmechanismen kommt es zur Invasion eines homologen DNA-Moleküls (im Regelfall ein Schwesterchromatid), aber es gibt Unterschiede wie dieser sogenannte *D-Loop* aufgelöst wird (Que et al., 2019). Bei dem Synthese-abhängigen Strang-*Annealing* dienen die homologen DNA-Sequenzen als Vorlage für die Reparatur, sodass der DNA-Doppelstrang ohne den Verlust von genetischer Information wiederhergestellt wird (Puchta und Fauser, 2014; Abbildung 3B). Bei der DSBR kommt es hingegen zu einem Strangaustausch, was zu einem *Crossover* zwischen homologen Chromosomen während der meiotischen Rekombination führt (Que et al., 2019).

Rund 50 % der Doppelstrangbrüche werden in Hefe- und Säugetierzellen durch den SDSA-Mechanismus repariert, was darauf hindeutet, dass in diesen Organismen das SDSA der bevorzugte Reparaturmechanismus ist (Liang et al., 1998). Jedoch ist, wie bereits weiter oben erwähnt, die Wahl des Reparaturmechanismus unter anderem von der Zellzyklusphase abhängig. In Pflanzen gibt es unterschiedliche Zelltypen in somatischen Geweben: Meristeme mit sich aktiv teilenden Zellen und differenzierte Gewebe mit sich nicht-teilenden Zellen. In somatischen Pflanzenzellen sind die Homologie-basierten

Reparaturmechanismen nur während der S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv, während die Endverknüpfungs-basierten Reparaturmechanismen während des gesamten Zellzyklus aktiv sind, aber vor allem in der G1-Phase (Puchta, 2005, Que et al., 2019).

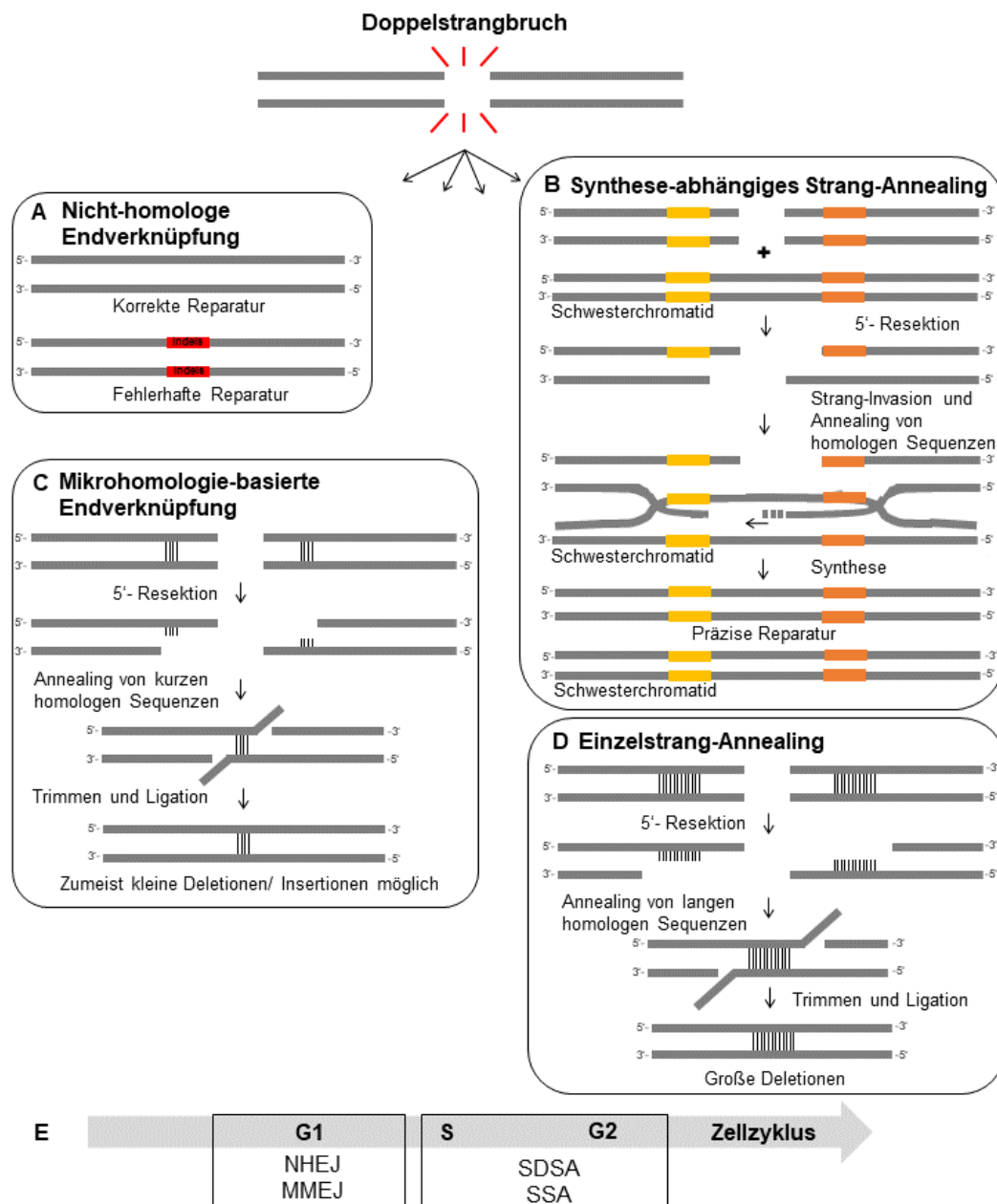


Abbildung 3: DNA-Reparaturmechanismen in somatischen Pflanzenzellen Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen hängt davon ab, ob es zu einer Resektion der DNA-Enden kommt. (A) Wird die Resektion blockiert, kommt es zu der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ). Dies ist ein relativ fehleranfälliger Reparaturmechanismus bei dem es zu Insertionen oder Deletionen (Indels) kommen kann. Kommt es zu einer Resektion der 5'-Enden konkurrieren drei Reparaturmechanismen miteinander (B-D). (B) Bei dem Synthese-abhängigen Strang-Annealing (SDSA) wird ein Schwesterchromatid als Reparaturvorlage verwendet. Dies führt zu einer präzisen Reparatur. Bei der Mikrohomologie-basierten Endverknüpfung (MMEJ; C) und dem Einzelstrang-Annealing (SSA; D) werden Sequenzwiederholungen auf beiden Seiten des Doppelstrangbruchs für die Reparatur verwendet. In Folge dessen kommt es zu kleinen (MMEJ) oder größeren Deletionen (SSA). Angelehnt an Ceccaldi et al., 2016

1.2.1. Präzise Genomeditierung

Mit der ursprünglichen CRISPR/Cas9-Technik ist eine gezielte Mutagenese möglich, das heißt, dass Mutationen an vorgegebener Stelle induziert werden, die entstehende Mutation aber nicht vorhersagbar ist. Durch die Verwendung von zwei gRNAs, die in einem gewissen Abstand zueinander einen Doppelstrangbruch induzieren, können vorhersagbare Deletionen von einer bestimmten Länge entstehen. Ein Schritt in Richtung präzise Veränderung von einzelnen Basen ist der Einsatz von Baseneditoren zusammen mit einem gRNA/Cas9-Nickase-Komplex. Bei der Nickase ist eine katalytisch aktive Domäne der Endonuklease ausgeschaltet, sodass sie nur einen Strang schneidet und einen sogenannten Nick/ Einzelstrangbruch erzeugt. Die Baseneditoren ermöglichen eine spezifische Umwandlung der Nukleobasen C zu T (oder auf dem DNA-Gegenstrang G zu A) bzw. A zu G (oder T zu C; Nishida et al., 2016; Gaudelli et al., 2017). Mit Hilfe des Prime-Editing-Ansatzes können gezielte Insertionen, Deletionen oder Basenumwandlungen hervorgerufen werden. Bei diesem Ansatz kommt eine Cas-Nickase in Kombination mit einer Reversen Transkriptase und einer speziellen *prime editing guide* RNA (pegRNA) zum Einsatz. Eine Besonderheit der pegRNA ist, dass sie bereits die Informationen für die gewünschte DNA-Veränderung trägt und kein zusätzliches Donor-Template benötigt wird (Anzalone et al., 2019). Auch die Homologie-basierten Reparaturmechanismen einschließlich der Mikrohomologie-basierten Endverknüpfung bergen das Potenzial, dass beliebige präzise Veränderungen der Wahl durch das Einbringen eines DNA-Fragments als Reparaturvorlage mit entsprechender Sequenzkompatibilität zu den Enden der geschnittenen DNA vorgenommen werden können (Puchta und Fauser, 2014). Sowohl das Prime-Editing als auch die Homologie-basierten Ansätze bedürfen jedoch zunächst noch einer methodischen Etablierung und Optimierung in Getreiden.

1.3. Modulare Vektorsysteme

Mit den RNA-geleiteten Endonukleasen stehen der Forschung effektive Werkzeuge zur gezielten Genveränderung zur Verfügung, insbesondere auch für Multiplex-Anwendungen der Genomeditierung, d.h. wenn mehrere Ziel motive in einem oder mehreren Genen simultan verändert werden sollen. Für die Anwendung des gRNA/Cas9-Systems müssen zunächst verschiedene Elemente in einem Vektor zusammengefügt werden. Essentielle Elemente für die zielgerichtete Mutagenese in Pflanzen sind gRNA-Expressionseinheiten und die codierende Sequenz der Cas9 im Kontext pflanzenspezifischer Promotoren und Terminatoren, die die *cas9*-Expression regulieren.

Zudem braucht es für die stabile Transformation von Pflanzen spezifische Selektionsmarker. Zumeist werden gRNA/cas9-Expressionseinheiten mittels Agrobakterien-vermitteltem oder biolistischem DNA-Transfer in die Pflanzenzellen gebracht. Für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation müssen die Expressionseinheiten in den Bereich der Transfer-DNA (T-DNA) eines Binärvektors kloniert werden. Die T-DNA wird dann in Pflanzenzellen übertragen und kann dort ins Genom integriert werden (zusammengefasst in Kumlehn und Hensel, 2009; Koepfel et al., 2019).

Der Zusammenbau solcher Vektoren kann sehr aufwendig und zeitintensiv sein. Neben der Komplexität der Vektoren spielt dabei auch eine entscheidende Rolle, dass die Genomeditierung eine noch relativ junge Technologie ist, die sich schnell weiterentwickelt. Es wäre also von Vorteil, wenn neue Elemente auf möglichst einfache Weise in für die spezifischen Anwendungen eines Labors zugeschnittene und funktionell überprüfte Vektoren übernommen werden können.

Die Verwendung von modularen und standardisierten Fragmenten zur gezielten und einfachen Klonierung von komplexen DNA-Konstrukten hat sich in der Molekularbiologie bewährt. Der Vorteil dabei ist, dass standardisierte Fragmente vorvalidiert sind, für verschiedene Anwendungen genutzt und einfach zwischen Laboren ausgetauscht werden können (Weber et al., 2011). Bereits 1996 wurde eine Strategie zur Assemblierung von verschiedenen Fragmenten entwickelt (Rebatchouk et al., 1996). Das NOMAD-System sollte den Zusammenbau von Modulen für molekularbiologische Standardanwendungen erlauben und verwendete bereits Typ-IIS- Restriktionsenzyme (s. Abschnitt 1.3.1) für den gerichteten Einbau eines Moduls in einen Assemblierungsvektor. Limitierend war dabei, dass pro Klonierungsschritt nur ein Modul in den Assemblierungsvektor kloniert werden konnte (Rebatchouk et al., 1996). Das Prinzip wurde mit dem BioBrick-System weiterentwickelt (Knight, 2003). Standardmodule wie Promotoren, Ribosombindestellen oder Terminatoren lassen sich mit diesem System in mehreren Klonierungsschritten zusammenbauen (Knight, 2003). Jedoch waren diese frühen Systeme immer noch aufwendig in der Anwendung und es konnten nicht mehrere Module in einem Schritt kombiniert werden (Weber et al., 2011). Mit dem modularen Klonierungssystem (*Modular cloning strategy*, MoClo) von Weber et al. (2011) wurde dann erstmals die gerichtete Assemblierung von mehreren standardisierten Modulen in nur einem Klonierungsschritt ermöglicht. Das MoClo-System basiert auf der *Golden-Gate*-Klonierung (s. Abschnitt 1.3.1) und enthält viele Module für verschiedene Anwendungen,

wie zum Beispiel Promotoren, 5'-untranslatierte Regionen, Signalpeptide, Codierungssequenzen und Terminatoren (Weber et al., 2011). Im selben Jahr wurde auch das GoldenBraid-System publiziert, das ebenfalls basierend auf der *Golden-Gate*-Klonierung den Zusammenbau von vielen verschiedenen Modulen für biotechnologische Anwendungen mit einem Fokus auf Pflanzen ermöglicht (Sarrion-Perdigones et al., 2011). Beide Systeme sind durch die Auswahl an zahlreichen Modulen und der Verwendung von unterschiedlichen Assemblierungsstrategien sehr komplex.

Als 2012 die RNA-geleiteten Endonukleasen für den biotechnologischen Einsatz zunächst in Prokaryoten und Säugetieren und etwas später auch in Pflanzen etabliert wurden, lag es nahe, für den Zusammenbau solcher komplexen Expressionsvektoren ebenfalls modulare Vektorsysteme zu entwickeln. Für die Anwendung der gRNA/Cas9-Technologie in Pflanzen gibt es bereits verschiedene modulare Systeme, die sich durch unterschiedliche Module und der Anwendbarkeit in verschiedenen Pflanzenarten unterscheiden (zum Beispiel: Ma et al., 2015; Xing et al., 2014; Lowder et al., 2015; Ordon et al., 2017; Čermák et al., 2017; Hahn et al., 2020). Die meisten modularen Vektorsysteme beruhen auf der *Golden-Gate*-Klonierung. Einige der publizierten Systeme sind Weiterentwicklungen des MoClo-Systems, in denen für die jeweilige Anwendung Module angefertigt wurden, die kompatibel zu den bereits vorhandenen MoClo-Modulen sind und somit nicht ein Vektorsystem von Anfang an neu kloniert werden musste (Lawrenson et al., 2015; Ordon et al., 2017; Kumar et al., 2018; Hahn et al., 2020). Auch das GoldenBraid-System wurde für die Anwendung von multiplexen Genomeditierungsansätzen weiterentwickelt (Dusek et al., 2020; Vazquez-Vilar et al., 2021). Eine Limitation der verfügbaren Systeme bestand zu Beginn dieser Arbeit (2017) jedoch darin, dass sie oftmals nur anhand transienter Expression getestet und/oder die Module nicht für die landwirtschaftlich besonders wichtigen monokotyledonen Nutzpflanzen konzipiert worden waren. Besonders Getreidepflanzen wie Gerste und Weizen sind nicht nur hinsichtlich der Transformation sehr anspruchsvoll, sondern erfordern auch die Verwendung spezieller Elemente. So können zum Beispiel Promotoren, die in Reis effizient funktionieren, weniger effizient in Weizen sein. In dieser Arbeit wurde deshalb das CasCADE-System als einfaches, aber doch vielfältig anwendbares modulares Vektorsystem für Genomeditierungsanwendungen mit Fokus auf Getreidepflanzen auf der Grundlage bekannter, gut funktionierender Elemente entwickelt. Dabei wurde bewusst kein bereits bestehendes Vektorsystem weiterentwickelt, da diese durch ihre große Bandbreite möglicher Anwendungen auch jenseits der Genomeditierung ohnehin

schon sehr komplex und damit wenig anwenderfreundlich waren. Zudem hätten so viele für unsere wissenschaftlichen Arbeiten relevanten Module ergänzt werden müssen, dass die Entwicklung eines neuen, optimal für die Genomeditierung von Pflanzen konzipierten modularen Systems kaum mehr Aufwand bedeutete.

1.3.1. *Golden-Gate-Klonierung*

Im Jahr 2008 wurde eine neue Klonierungsmethode für den korrekten Zusammenbau von mehreren Fragmenten in nur einem Klonierungsschritt beschrieben (Engler et al., 2008). Diese sogenannte *Golden-Gate-Klonierung* basiert auf der Verwendung von Typ-II-Restriktionsenzymen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden (Abbildung 4). So können Fragmente erstellt werden, die von zwei Typ-II-Erkennungssequenzen flankiert werden und das Fragment so schneiden, dass die Erkennungssequenz als Teil des Fragments eliminiert wird und individuelle Überhänge entstehen. Diese Überhänge können so gewählt werden, dass sie von zwei zu verbindenden Elementen jeweils zueinander komplementär sind und nahtlos ligieren. Dies ermöglicht die gerichtete Assemblierung von mehreren Fragmenten in einem Reaktionsgefäß mit nur einem Restriktions-/Ligationsschritt (*One pot, one step*; Engler et al., 2009).

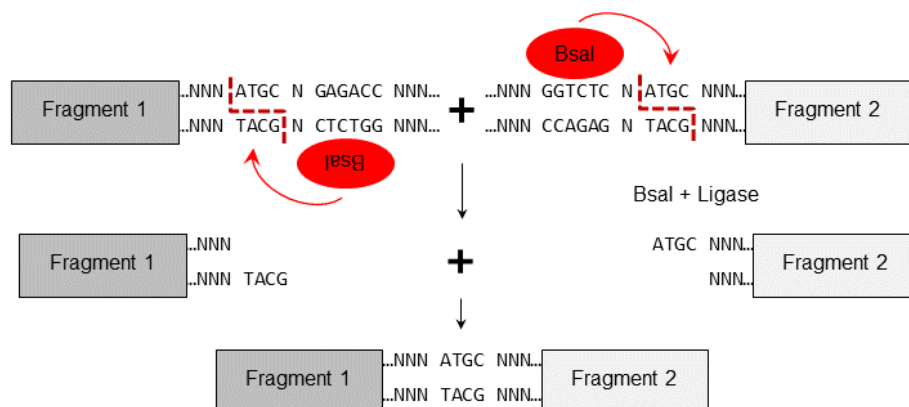


Abbildung 4: Golden-Gate-Klonierung Wenn zwei Fragmente, die von den gleichen Nukleotiden und BsaI-Erkennungssequenzen flankiert sind, mit BsaI verdaut werden, entstehen vier Nukleotid-lange Überhänge die zueinander komplementär sind. Diese können hybridisieren und anschließend ligiert werden und ermöglichen so einen gerichteten Zusammenbau von mehreren Fragmenten.

1.4. Mehltau und Rostpilze sind wichtige Schaderreger bei Weizen und Gerste

Weizen (*Triticum aestivum*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) gehören zu den wichtigsten und meist-angebauten Getreidearten der Welt. Beide sind monokotyledone Pflanzen aus der Familie der Süßgräser (*Poaceae*). Weizen nimmt mit ca. 215 Millionen Hektar weltweit die größte Fläche (ca. 15 % der Anbaufläche) aller kultivierten Pflanzen ein und ist in vielen Regionen der Erde die wichtigste Grundlage der menschlichen Ernährung

(FAO, 2019). Mit einer Größe von ca. 17 Giga-Basenpaaren (Gbp) hat Weizen ein sehr großes und komplexes Genom, das erst kürzlich entschlüsselt wurde (Ramírez-González et al., 2018). Durch natürlich vorgekommene Hybridisierungen ist der moderne Weizen aus drei Arten entstanden. Er ist somit hexaploid (AA BB DD) und enthält Genome, die von Einkorn (*Triticum monococcum*, AA), Emmer (*Triticum speltoides*, BB) und *Aegilops*/Ziegenras (*Aegilops tauschii*, DD) abstammen (Brenchley et al., 2012). Gerste zählt zu den ältesten domestizierten Kulturpflanzen und ist heute gemessen am Ernteertrag von ca. 31.000 Hektogramm die viertwichtigste Getreidepflanze weltweit (Mayer et al., 2012; FAO, 2019). Im Gegensatz zum Weizen hat Gerste ein Genom mit einer Größe von 5.1 Gbp. Das Gerstengenom wurde bereits 2012 entschlüsselt und kürzlich noch durch verbesserte Datensätze ergänzt (Mayer et al., 2012; Mascher et al., 2017, Milner et al., 2019).

Kulturpflanzen stehen permanent unter dem Befallsdruck von Pathogenen. Neben Insekten und Viren verursachen Pilzkrankheiten wie Rost (*Puccinia* spp.) und echter Mehltau (*Blumeria graminis*) ernstzunehmende Ertragsverluste. Rost- und Mehltaupilze rangieren unter den Top 10 der wichtigsten Pilzkrankheiten für Getreide und gehören zu der Klasse der obligat biotrophen Pilze (Voegelé und Mendgen, 2003; Dean et al., 2012). Beide Gattungen werden in den folgenden Abschnitten genauer vorgestellt.

1.4.1. Getreideroste

Die Getreideroste gehören zu den für die Landwirtschaft schädlichsten Krankheitsgruppen und haben das Potenzial für zerstörerische Epidemien. Dies wird durch die hohe Reproduktionszahl innerhalb einer Saison, die große Anzahl an Sporen und ihre Fähigkeit, große Distanzen zu überwinden begünstigt (Hulbert und Pumphrey, 2013). Zudem haben die Pathogene das Potenzial sexuell zu rekombinieren und schnell zu mutieren, um die Wirkungsmechanismen von Resistenzgenen zu überwinden (Marasas et al., 2004). Rostpilze gehören zu der Gruppe der Ständerpilze (Basidiomycota).

Getreideroste sind heterözisch und benötigen zwei taxonomisch nicht verwandte Wirte, um ihren Lebenszyklus mit fünf Sporenstadien zu durchlaufen (Abbildung 5; Kolmer, 2012). Die Pilze können sich sowohl in Form von asexuellen Sporen als auch sexuellen Sporen vermehren.

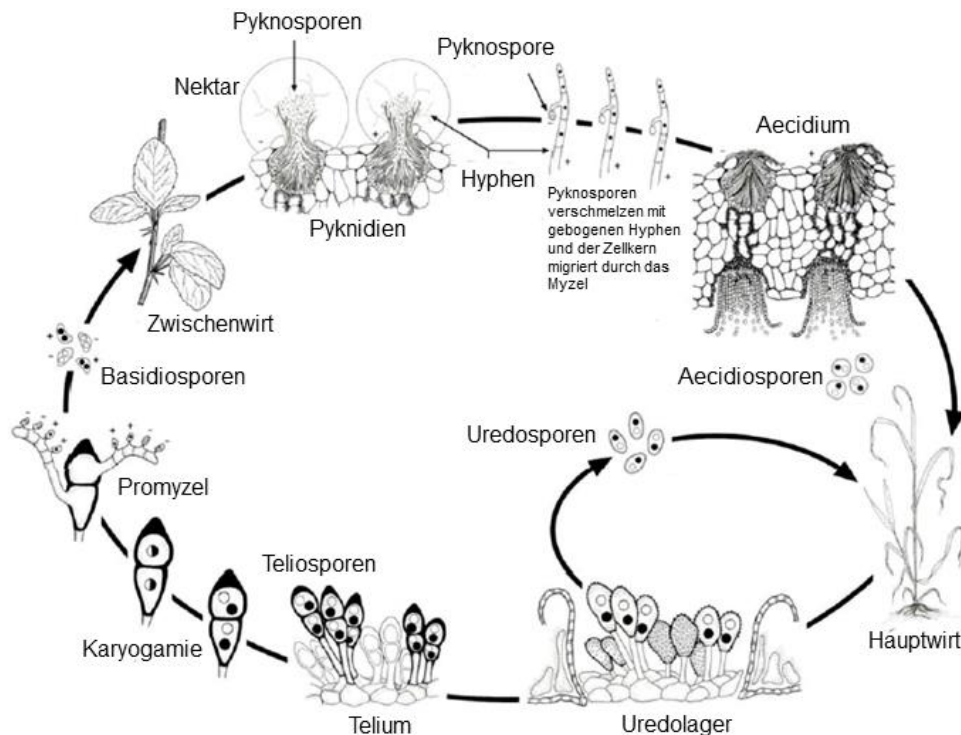


Abbildung 5: Der Lebenszyklus der Getreideroste Die Getreideroste sind makrozyklisch und haben fünf verschiedene Stadien: Uredosporen, Teliosporen und Basidiosporen auf Getreidewirten sowie Pyknosporen und Aecidiosporen auf den alternativen Wirten. Aecidiosporen infizieren den Getreide-Hauptwirt und eine Vielzahl an Uredolagern entsteht. In den Uredolagern werden innerhalb von 14 bis 20 Tagen ungeschlechtliche Uredosporen gebildet, die wieder den Hauptwirt infizieren können. Mit Bildung der Teliosporen im Spätsommer beginnt der sexuelle Lebenszyklus. Teliosporen sind braune, dickwandige und gegen Trockenheit und Kälte widerstandsfähige Sporen, die auf dem Feld überwintern können. In den reifenden Teliosporen entstehen durch Karyogamie diploide Zellkerne. Die im Promyzel gebildeten Basidiosporen infizieren im Frühjahr den Zwischenwirt und haploide Pyknidien werden gebildet. Pyknosporen und gebogene Hyphen verschmelzen miteinander und dikaryotische Aecidien entstehen, in denen Aecidiosporen gebildet werden. Abbildung aus Leonard und Szabo, 2005; Kolmer, 2012

Die dikaryotischen Uredosporen werden in Sporenlagern gebildet und sind in der Lage, sich auf den Getreidewirten kontinuierlich zu vermehren (Bolton et al., 2008; Kolmer, 2012). Teliosporen entwickeln sich in den uredinialen Infektionsstellen und diese wachsen zu einem Promyzel, indem die dikaryotischen Kerne zu einem diploiden Kern verschmelzen (Bolton et al., 2008; Kolmer, 2012). Die Teliosporen keimen und durchlaufen eine Meiose, wobei vier haploide Basidiosporen entstehen. Diese befallen den Zwischenwirt und führen dort zu Pyknidien, in denen haploide Pyknosporen und gebogene Hyphen (männliche und weibliche Gameten) gebildet werden (Bolton et al., 2008). Die Pyknosporen werden häufig von Insekten verbreitet, wodurch Kombinationen von Pyknosporen und gebogenen Hyphen des entgegengesetzten Paarungstyps aufeinandertreffen und verschmelzen. Daraus entsteht ein dikaryotisches Myzel, das sich im Wirtsblatt ausbreitet (Bolton et al., 2008; Kolmer, 2012). Auf den Blattunterseiten werden Aecidien gebildet, in denen die Aecidiosporen entstehen. Die Aecidiosporen

werden durch den Wind verbreitet und infizieren den Getreidewirt auf dem wiederum Uredolager und Uredosporen gebildet werden, die entweder zirkulieren oder sich zu Teliosporen entwickeln, den Zwischenwirt infizieren und so den Lebenszyklus vervollständigen (Kolmer, 2012). Die meisten Rostpilze sind hochspezialisierte Pathogene mit oft genetisch sehr diversen Rassen oder Pathotypen, die auf bestimmte Wirtsarten spezialisiert sind und sich durch Virulenz/Avirulenz gegenüber unterschiedlichen Wirtsgenotypen unterscheiden (Kolmer, 2012). Eine Übersicht der phänotypischen Symptome von Rosterkrankungen sind in Abbildung 6 dargestellt.

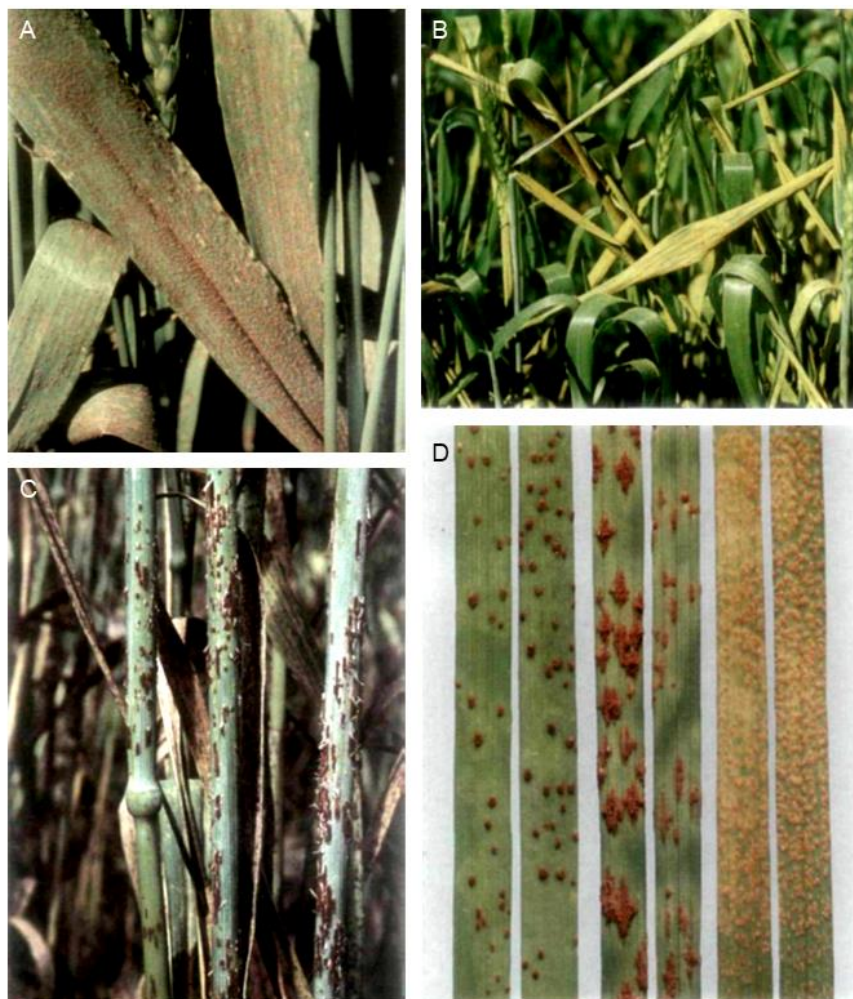


Abbildung 6: Symptome von Rost in Weizen (A) Braunrost (B) Gelbrost (C) Schwarzrost (D) Symptome von Braunrost, Schwarzrost und Gelbrost auf Blättern (l-r) Abbildungen aus McIntosh et al., 1995

1.4.1.1. Braunrost

Braunrost, verursacht durch *Puccinia triticina* und *Puccinia hordei*, ist bei Weizen und Gerste die verbreitetste Rostkrankheit (Marasas et al., 2004). Ertragseinbußen entstehen durch eine geringere Anzahl an Körnern pro Ähre und durch geringere Korngewichte (Bolton et al., 2008). Der Lebenszyklus von Braunrost umfasst wie bei allen Rostpilzen

fünf Sporenstadien und zwei Wirtarten, wobei als Zwischenwirte *Thalictrum* spp. und *Isopyrum* spp. Arten dienen (Bolton et al., 2008). Die Uredosporen werden in den charakteristischen orange- bis braunfarbenen Uredolagern (Pusteln) auf den Blattoberflächen gebildet. Studien zeigen, dass Braunrost zu den Pilzarten gehört, die sich vorrangig asexuell vermehren (Milgroom, 1996; Goyeau et al., 2007). Dies hat den Vorteil für den Pilz, dass die am besten angepassten Pathotypen in großen Mengen reproduziert werden (McDonald und Linde, 2002). Dennoch kann sich der Pilz durch sexuelle Reproduktion schnell an neue Resistenzgene anpassen und wird auch mit fortschreitender Resistenzzüchtung ein bedeutender Schaderreger bleiben (Weibull et al., 2003).

1.4.1.2. Gelbrost

Gelbrost bei Weizen, verursacht durch *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, kommt vor allem in Getreideanbaugebieten mit kühlen und feuchten Witterungsbedingungen während der Wachstumsperiode vor (Chen et al., 2014). Das Schadbild umfasst Beeinträchtigungen der pflanzlichen Entwicklung und es werden weniger Körner pro Ähre gebildet. Bei stärkerem Befall ist auch mit einem verringerten Korngewicht zu rechnen (Prescott et al., 1986). Gelbrost lässt sich an den streifenförmig-perlschnurartig angeordneten, rostähnlichen zunächst orangegelben, später hellgelben Pusteln auf den Blättern erkennen. Zwischenwirte, die von den Basidiosporen befallen werden, sind Arten der Gattungen *Berberis* oder *Mahonia* (Jin et al., 2010; Chen et al., 2014). Mit der systematischen Entfernung von *Berberis*-Arten in Europa und Nordamerika im 20. Jahrhundert (1918-1980) wurde der Entwicklung von neuen Pathotypen von Gelb- und Schwarzrost entgegengewirkt und in Kombination mit dem Einsatz von resistenten Sorten konnte das Infektionsgeschehen zunächst eingedämmt werden (Leonard und Szabo, 2005; Dean et al., 2012). Jedoch traten in den letzten Jahrzehnten aufgrund von neuen und aggressiven Rassen, die auch an wärmere Regionen angepasst waren, weitverbreitete Epidemien auf (Hovmøller et al., 2011). Gelbrost bei Gerste verursacht durch *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* tritt ebenfalls in kühleren Anbaugebieten auf, vor allem in Europa und Amerika, und kann desaströse Epidemien auslösen (Brown et al., 2001).

1.4.1.3. Schwarzrost

Schwarzrost wird zumeist durch *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* verursacht und ist ebenfalls ein wichtiger Schaderreger mit einer weiten geografischen Verbreitung, der

sowohl Weizen als auch Gerste befällt. Zumeist tritt Schwarzrost in warmen Gebieten auf. Als Zwischenwirt dienen wie bei Gelbrost Arten der Gattung *Berberis* (Leonard und Szabo, 2005). Bei den Getreiden treten die Infektionen hauptsächlich an den Stängeln und Blattscheiden auf. Innerhalb von 8-10 Tagen nach der Infektion werden die durch Uredosporen verursachten Pusteln sichtbar (Figueroa et al., 2016). Die Pusteln sind linear bis rautenförmig angeordnet und können bis zu 10 mm lang werden (Leonard und Szabo, 2005). Durch eine Infektion wird der Nährstoffzufluss von den Stängeln zu den sich entwickelnden Ähren beeinträchtigt, was zu verkümmerten Körnern führt. Zudem wird die Stabilität der Halme geschwächt, was sie anfällig für ein Umknicken (Lagern) macht (Leonard und Szabo, 2005). Ein Infektionsausbruch kann verheerende Folgen bis hin zur Vernichtung ganzer Ernten haben (Leonard und Szabo, 2005).

1.4.2. Mehltau

Getreidemehltau wird durch *Blumeria graminis* ausgelöst. Pathogene dieser Art sind sehr Wirtsspezialisiert, das heißt, dass eine Mehltau-Unterart in der Regel nur eine Pflanzenart befallen kann (Bourras et al., 2018). Mehltau gehört zu der Gruppe der Schlauchpilze (Ascomycota). Mehltau kommt in den meisten Getreideanbaugebieten vor, wobei der Befall durch milde Temperaturen, eine hohe relative Luftfeuchtigkeit und dichte Bestände begünstigt wird (Weibull et al., 2003; Cowger et al., 2012). Durch Mehltau wird der Kornertrag beeinträchtigt, indem weniger Ähren und Körner gebildet werden und das Korngewicht verringert ist. Generell sind Ertragseinbußen von mehr als 40 % selten, aber frühe Infektionen können zum Eingehen von Keimlingen führen oder das Bilden von Ähren verhindern (Singh et al., 2016). Die große wirtschaftliche Bedrohung dieser Krankheit beruht auf der Fähigkeit des Pilzes, sich an neue Resistenzgene anzupassen und sich schnell zu vermehren (Weibull et al., 2003).

Mehltau vermehrt sich vorwiegend über ungeschlechtliche Konidien, die in Mehltaukolonien auf der Blattoberfläche gebildet werden (Jorgensen und Wolfe, 1994). Ein Vorteil gegenüber anderen Pathogenen ist, dass die Konidien kein Wasser zum Keimen benötigen (Thordal-Christensen et al., 2000). Die Konidien des Mehltaus verbreiten sich nicht über so große Distanzen wie die Sporen der Rostpilze, jedoch ist die Evolutionsrate der Mehltaupilze besonders hoch (Duveiller et al., 2007). Auf den Blattoberflächen können die Konidien schnell keimen und ein Apressorium bilden, das durch eine Epidermiszelle ins Blattinnere dringt und dort ein Haustorium bildet. Aus sekundären und tertiären Hyphen bilden sich weitere Haustorien und innerhalb eines

kurzen Zeitraumes hat sich ein ganzes Netzwerk gebildet (Thordal-Christensen et al., 2000). Auf der Blattoberfläche sind Mehлтаukolonien aus weißem Myzel sichtbar in denen neue Konidien produziert werden (Abbildung 7; Jorgensen und Wolfe, 1994).

Mit voranschreitender Infektion entstehen im Spätsommer durch sexuelle Vermehrung dunkle Kleistothecien (Fruchtkörper) in denen Ascosporen gebildet werden. Jedoch konnten Hacquard et al. (2013) zeigen, dass die Vermehrung von Mehltau zumeist über die asexuellen Konidien stattfindet und eine sexuelle Vermehrung eher selten ist. Die Konidien können milde Winter durch den Befall von Ausfallkörnern oder Zwischenwirten überleben.

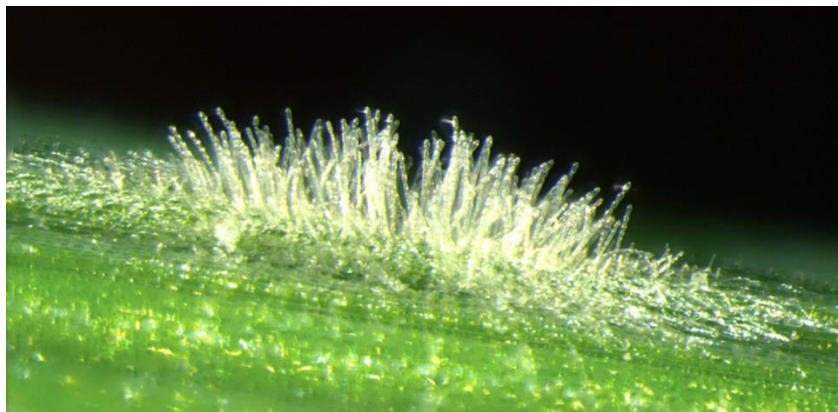


Abbildung 7: Infektion von Gerste mit *Blumeria graminis* Abbildung aus Pedersen et al., 2012

1.4.3. Haustorien - die speziellen Ernährungsorgane

Rost- und Mehltaupilze haben eine spezialisierte Infektionsstruktur, die die dauerhafte biotrophe Assoziation mit dem Wirt ermöglicht: das Haustorium (Garnica et al., 2014). Rostpilze dringen über Keimschläuche in das Blattinnere ein und dikaryotische Haustorien entwickeln sich aus extrazellulären Haustorienmutterzellen (HMZ), die die Mesophyllzellen der Wirtspflanze penetrieren (Abbildung 8). Die Haustorienmutterzellen ähneln funktionell einem Appressorium (Voegelé und Mendgen, 2003).

Mehltaupilze bilden ihre Haustorien dagegen nur in Epidermiszellen (Thordal-Christensen et al., 2000). Ausgehend vom Appressorium wird eine Penetrations-Hyphe gebildet, die die äußere Epidermis-Zellwand durchdringt. Die erfolgreiche Penetration führt dann zu der Bildung eines Haustoriums in der Epidermiszelle der Wirtspflanze (Thordal-Christensen et al., 2000). Genaugenommen sind Haustorien apoplastische Formierungen, da sie nicht die Plasmamembran der Wirtszelle durchdringen. Stattdessen wird die Plasmamembran gedehnt und eingestülpt, sodass sie sich als extrahaustoriale Membran um das Haustorium legt (Thordal-Christensen et al., 2000).

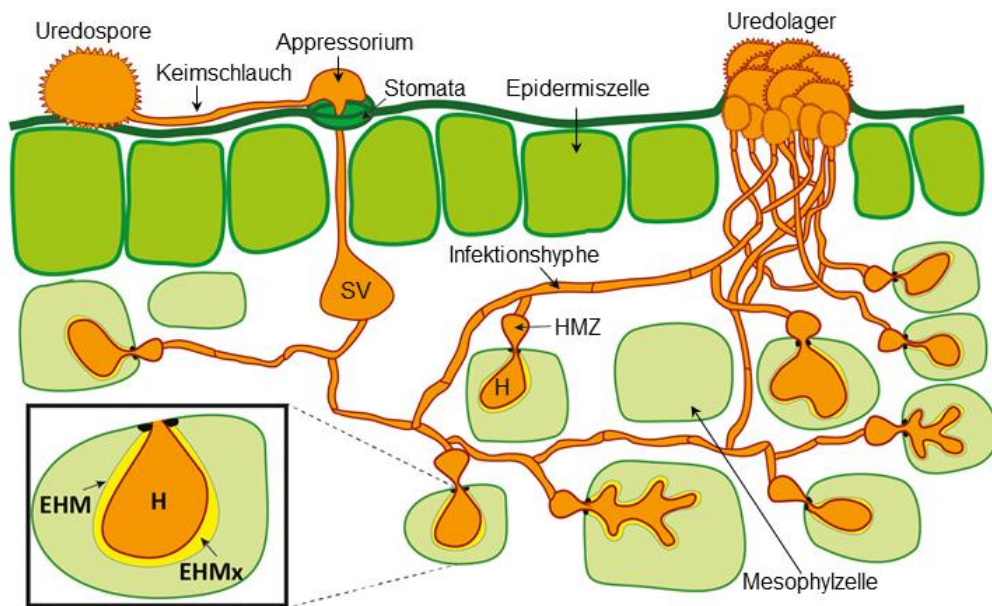


Abbildung 8: Die Entwicklung einer Rostinfektion und die Bildung von Haustorien Die Uredospore bildet auf der Blattoberfläche innerhalb von sechs Stunden einen Keimschlauch. An einer Stomataöffnung wird ein Appressorium gebildet, durch das der Keimschlauch in das Blatt eindringen kann und sich zu einem substomatalen Vesikel (SV) weiterentwickelt. Ausgehend von dem SV wachsen primäre Infektionshyphen durch das Blatt. Sobald die Infektionshyphen mit Mesophyllzellen in Kontakt kommen, werden Haustorienmutterzellen (HMZ) gebildet. Die HMZ penetrieren die Mesophyllzellen und bilden ein Haustorium (H). Das Haustorium ist durch die extrahaustoriale Matrix (EHMx) und die vom Wirt stammende extrahaustoriale Membran (EHM) vom Cytoplasma der Wirtspflanze separiert. Die Infektion breitet sich aus und nach 10 bis 11 Tagen formen die Infektionshyphen sporenbildende Basalzellen, die die Basis des Uredolagers darstellen, in dem dann neue Uredosporen gebildet werden. Abbildung aus Garnica et al., 2014

Zusammen mit der Zellwand des Pilzes und der extrahaustorialen Matrix entsteht so eine abgetrennte Zone zwischen den Plasmamembranen des Wirts und des Pilzes (Voegelé und Mendgen, 2003). An die extrahaustoriale Matrix schließen sich lange tubuläre Verlängerungen an, die weit in das Cytoplasma der Zelle hineinreichen und Vesikel-ähnliche Strukturen sezernieren (Mims et al., 2002). Vermutlich werden über diesen Weg von Avirulenzgenen codierte Effektorproteine abgegeben, um die Immunreaktionen der Wirtspflanze zu manipulieren (Garnica et al., 2014). Genom- und Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass alle Rostpilze 500 bis 1500 potenzielle Avirulenzgene haben (Garnica et al., 2014). Zudem wird Mannitol als Radikalfänger von den Pilzen abgegeben, um die auf reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive oxygen species*, ROS) basierende Immunantwort der Pflanze zu unterdrücken (Voegelé und Mendgen, 2003). In der Haustorienmembran lokalisierte, spezialisierte Transporter sorgen für die Aufnahme von Aminosäuren und Zuckern aus der Wirtspflanze in den Pilz (Voegelé und Mendgen, 2003).

1.5. Resistenzgene

Der effektivste und umweltfreundlichste Weg zur Bekämpfung dieser Krankheiten ist der Einsatz von resistenten Sorten. Daher sind Rost- und Mehlttauresistenzen eines der Hauptziele vieler Getreide-Zuchtprogramme auf der ganzen Welt und mit der Resistenzzüchtung wurde bereits in den 1930er-Jahren begonnen (Weibull et al., 2003; Hulbert and Pumphrey, 2014). Es ist abzusehen, dass die erwarteten klimatischen Veränderungen in den gemäßigten Breiten die Ausbreitung von Rostpilzen begünstigen und aufgrund zunehmender genetischer Diversifizierung zur beschleunigten Entstehung neuer Pathotypen und damit verbundener Epidemien führen werden (Mylonas et al., 2020). In den letzten Jahren hat dieser Prozess bereits begonnen. Zum Beispiel hat 2016 eine bisher unbekannte Rasse des Schwarzrostes die Weizenernte auf Sizilien praktisch vernichtet. Zudem haben zwei neue Pathotypen des Gelbrostes in Europa und Nordafrika bzw. in Ostafrika und Zentralasien zu großen Ertragsschäden und Qualitätseinbußen geführt (Hovmøller et al., 2011; Bhattacharya, 2017). Die Verwendung neuer Resistenzgene gegen Gelbrost und Schwarzrost wurden in den Europäischen Zuchtprogrammen des ausgehenden 20. Jahrhunderts tendenziell vernachlässigt, da diese Krankheiten als besiegt galten. Erst als 1999 der neue Schwarzrost-Pathotyp Ug99 die Weizenernte in Uganda vernichtet hatte und sich seitdem weltweit ausbreitet, ist diese Krankheit wieder in den Fokus gerückt (Herrera-Foessel et al., 2014; Bhattacharya, 2017). Die hohe genetische Dynamik der Rostpilze gepaart mit den potentiellen Einflüssen des Klimawandels auf die Entwicklung und Verbreitung von Pathogenen macht es also notwendig, dass neue, möglichst dauerhaft resistente Getreidesorten gezüchtet werden.

In zugelassenen Sorten werden wirksame, zumeist rassenspezifische Resistenzgene jedoch insbesondere in Abhängigkeit der individuellen Möglichkeiten der Züchter und aufgrund des freien Marktes ohne übergeordnetes, regionales Züchtungsmanagement entweder einzeln verwendet oder auf unterschiedliche Weise miteinander kombiniert. Dies hat den Nachteil, dass die einzelnen Resistenzen sukzessive von den genetisch überaus dynamischen Pathogenen überwunden werden können und von Wissenschaft und Züchtern immer wieder neue Resistenzgene gefunden und in aktuelles Zuchtmaterial eingebracht werden müssen. Dabei wird es zunehmend schwieriger, neue Resistenzen mit realistischem Aufwand und in ausreichend kurzer Zeit sowie ohne Übertragung genetisch gekoppelter, nachteiliger Genvarianten zu erschließen. Da Pflanzenzüchtung ein aufwendiger und sehr langwieriger Prozess ist und das Überwinden von Resistenzen

durch neue Pathogenrassen zu zum Teil desaströsen wirtschaftlichen Schäden führen kann oder den vermehrten Einsatz von Pestiziden erfordert, wäre es von großem Vorteil, dauerhaft Resistenz-vermittelnde Genvarianten einzusetzen.

Pflanzen haben bei einem Pathogenbefall eine Reihe von Abwehrreaktionen. In der Regel werden konservierte Pathogenbestandteile, auch bekannt als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), von intrazellulären oder extrazellulären Rezeptoren der Pflanzen erkannt und daraufhin wird eine Reaktion, bekannt als PAMP-vermittelte Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PTI), ausgelöst (Dodds et al., 2009). Dieses Abwehrprinzip verhindert wirksam eine Infektion durch nicht angepasste Krankheitserreger und gehört zur ersten Ebene pflanzlicher Abwehrreaktionen (Jones und Dangl, 2006; Dodds et al., 2009). Jedoch können Pathogene diesen ersten Abwehrmechanismus der Pflanzen überkommen, indem sie Effektorproteine sekretieren, die direkt in den PTI-Signalprozess oder nachgeschaltete Reaktionen eingreifen (Chisholm et al., 2006; Jones und Dangl, 2006). Solche Effektorproteine werden wiederum von intrazellulären Rezeptoren erkannt, die zum zweiten Level der pflanzlichen Pathogenabwehr gehören. Diese Rezeptoren entsprechen den klassischen Resistenzgenen, deren Funktion auf einer Gen-für-Gen Interaktion beruht. Die Effektorproteine sind Produkte von Avirulenzgenen und deren direkte oder indirekte Erkennung durch die pflanzlichen Resistenzproteine wird als Effektor-vermittelte Immunität (*Effector-triggered immunity*, ETI) bezeichnet (Dodds et al., 2009). Allerdings ist die Unterscheidung zwischen PAMPs und Effektorproteinen nicht trivial und daher manchmal willkürlich (Hulbert and Pumphrey, 2014). Es gibt zahlreiche Gene (z.B. >150 in Weizen), die mit einer Resistenz gegen die verschiedenen Rostpilze und Mehltau in Verbindung gebracht werden (Lagudah, 2011). Die meisten von ihnen werden als rassespezifische Resistenzgene klassifiziert und beruhen auf der Gen-für-Gen Interaktion mit den pathogenen Avirulenzgenen (Parlevliet, 1985; Dodds et al., 2009). In der Regel ist diese Art der Resistenz eine Keimlingsresistenz, die Pflanzen sind also bereits in einem jungen Stadium resistent. Diese Resistenz ist für gewöhnlich monogen, also durch ein einziges Gen kontrolliert, in allen Wachstumsstadien ausgeprägt und hypersensitiv (Atia et al., 2021). Aufgrund des hohen evolutionären Potenzials des Erregers ist diese Resistenz meist relativ kurzlebig (McDonald und Linde, 2002). Die meisten der bereits identifizierten Resistenzgene gehören zu den Nukleotid-bindenden Leucin-reichen Repeat (*Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing*, NLR) -Genen (Hulbert and Pumphrey, 2014). NLRs sind durch drei Domänen charakterisiert:

Ein variabler C-Terminus, eine Nukleotid-bindende, zentral positionierte Domäne und eine aus Leucin-reichen *Repeats* (*Leucine-rich Repeat*, LRR) bestehende Domäne, die bezüglich ihrer Anzahl variieren kann (Ye und Ting, 2008).

Partielle Resistenzen sind zumeist dauerhaft und rasseunspezifisch, d.h. nicht nur gegen alle Rassen eines Pilzes, sondern meist gegen mehrere Arten pathogener Pilze wirksam (Parlevliet, 1985; Ellis et al., 2014). Sie wird oft als Resistenz adulter Pflanzen (*Adult plant resistance*, APR) bezeichnet, weil sie trotz möglicher Infektion während des Jungpflanzenstadiums durch eine reduzierte Rate der Krankheitsentwicklung gekennzeichnet ist (Ellis et al., 2014). Die Resistenz erwachsener Pflanzen (APR) ist in der Regel polygen, d.h. sie wird von mehreren Genen (mit jeweils geringer Wirkung) kontrolliert und ist nicht hypersensitiv (Atia et al., 2021). Es gibt jedoch auch wenige beschriebene Gene, von denen spezielle Varianten jeweils allein eine solche Resistenz vermitteln. Dazu gehören die Braunrost-Resistenzgene (*Leaf rust resistance*) *Lr34* und *Lr67*, deren Genprodukte keine intrazellulären NLR-Proteine, sondern membrangebundene Transporter sind (Hulbert und Pumphrey, 2014).

1.6. *Lr67*-basierte Resistenz in Weizen und Gerste

Das *Lr67*-Resistenzgen wurde zuerst in Weizen beschrieben und codiert auf dem D-Genom für den Hexose-Protonen-Symporter STP13 (*Sugar transport protein 13*). *Lr67* ist auch bekannt als *Yr46* (*Yellow rust resistance gene 46*), *Sr55* (*Stem rust resistance gene 55*), *Pm46* (*Powdery mildew resistance gene 46*) und *Ltn3* (*Leaf tip necrosis associated gene 3*; Herrera-Foessel et al., 2014). Dies impliziert bereits, dass das Resistenzvermittelnde *Lr67res* (*resistant*, res) -Allel in Weizen eine universelle Resistenz gegen Schwarzrost (*Puccinia graminis*), Gelbrost (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), Braunrost (*Puccinia triticina*) und Mehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) bewirkt und phänotypisch mit einer Blattspitzen-Nekrose assoziiert wird. Das wurde anhand von Feldversuchen mit Kreuzungslinien und transgenen *Lr67res*-Pflanzen gezeigt (Herrera-Foessel et al., 2011; Herrera-Foessel et al., 2014; Moore et al., 2015). Dagegen sind die Pflanzen anfällig, wenn nur das Wiltyp-Allel *Lr67sus* (*susceptible*, sus) vorhanden ist. Das *Lr67sus*-Allel unterscheidet sich in zwei Aminosäuren von *Lr67res*: Im Protein ist Glycin (G) an Position 144 zu Arginin (R) verändert und Valin (V) an Position 387 ist zu Leucin (L) verändert (Abbildung 9).

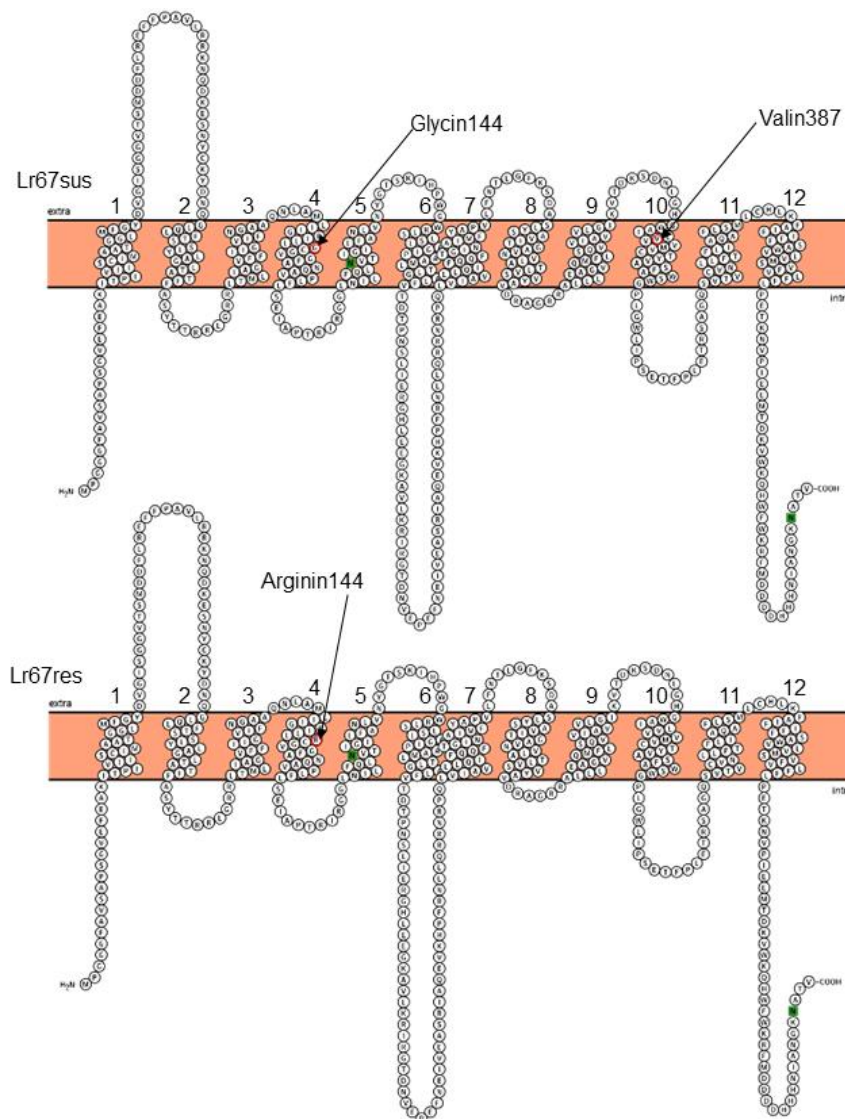


Abbildung 9: Modellierte Proteinstrukturen von Lr67sus und Lr67res Die zweidimensionalen Proteinstrukturen wurden mit PROTTER (<https://wlab.ethz.ch/protter/start/>) modelliert. Die durch Einzelbasenaustausche verursachten Veränderungen in der Lr67-Aminosäuresequenz sind durch Pfeile und rote Kreise markiert. Der Resistenz-vermittelnde Aminosäureaustausch Glycin144Arginin liegt in der vierten Transmembrandomäne.

Moore et al. (2015) und Milne et al. (2019) haben gezeigt, dass sich der kausale Resistenz-vermittelnde Einzelbasenaustausch (*Single nucleotide polymorphism*, SNP) im zweiten Exon befindet und den Aminosäureaustausch G144R verursacht (Moore et al., 2015; Milne et al., 2019). Die G144R-verursachende Mutation liegt innerhalb der vierten von zwölf Transmembrandomänen des Proteins. Das Lr67sus (Wildtyp) -Protein wurde im heterologen Hefesystem als funktionaler Zuckertransporter bestätigt, während das Lr67res-Protein keine Glukose in die Zelle importieren kann. Außerdem wurde gezeigt, dass die *Lr67*-Homeoallele auf dem A- und B-Genom ebenfalls für funktionale Zuckertransporter codieren. Eine Co-Expression von *Lr-D67res* mit *Lr-D67sus*, *Lr-A67*

oder *Lr-B67* führte zu einer Reduktion des Zuckertransports, was auf einen zumindest partiell dominanten Effekt des Resistenzallels hindeutet (Moore et al., 2015).

Die Annahme, dass die drei *Lr67*-Homeoallele des Weizens miteinander interagieren, konnte in einem bimolekularen Fluoreszenz-Komplementations-Assay (*Bimolecular fluorescence complementation assay*, BiFC) in *Nicotiana benthamiana* bestätigt werden. Die *Lr67*-Proteine formen sowohl Homo- als auch Heterodimere mit den Proteinen der *Lr67*-Homeoallele (Moore et al., 2015; Huai et al., 2020). Andererseits gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass *Lr67* keine Hetero-Oligomere mit anderen Mitgliedern der STP-Proteinfamilie bilden (Huai et al., 2020). Ein *Virus-induced gene silencing* (VIGS)-basierter Ansatz zum simultanen Knock-down aller drei *Lr67*-Allele führte ebenfalls zu erhöhter Resistenz gegen Gelbrost (Huai et al., 2020).

Des Weiteren erwiesen sich Gerstenlinien mit einem *Lr67res*-Transgen aus Weizen im Vergleich zum Wildtyp als resistenter gegen Braunrost (*Puccinia hordei*; Moore et al., 2015; Milne et al., 2019) und Mehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*; Milne et al., 2019). Die codierenden Sequenzen der Gersten- und Weizen-Orthologe *HvStp13* und *Lr67* (A, B und D) sind zu 98,8 % identisch. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das endogene *HvStp13* ebenfalls ein potenzielles Resistenzgen sein könnte. Jedoch sind keine Gerstenakzessionen mit einem Resistenz-vermittelnden *Stp13*-Allel bekannt (Milne et al., 2019). Milne et al. (2019) haben anhand heterologer Hefeassays gezeigt, dass *HvSTP13* ebenfalls ein funktionaler Zuckertransporter ist und mutierte *STP13* Varianten *HvSTP13-G144R* und *HvSTP13-V387L* keinen Zucker bzw. weniger Zucker transportieren können. Außerdem führte eine Co-Expression von *HvStp13* mit *HvStp13-G144R* oder *Lr67res* zu einer Verminderung des Zuckertransports in die Zellen.

Der Mechanismus, wie die Resistenz durch *Lr67* vermittelt wird, ist bisher nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass durch eine dominant-negative Interaktion von *Lr67res* mit den durch die anderen Homeoallele codierten *Lr-A67* und *Lr-B67* im Kontext heteromultimerer Proteinkomplexe der Netto-Zuckertransport vom Apoplasten in die Zelle reduziert wird (Moore et al., 2015).

Das Weizen-Allel *Lr67res* wurde ausschließlich in Landrassen und Sorten aus dem ostasiatischen Raum gefunden. *Lr-D67* ist mit dem *Reduced Height-D1* (*Rht-D1*) Wildtyp-Allel auf Chromosom 4DS - und damit mit Langstrohigkeit - gekoppelt (Moore et al., 2015). Dadurch wurde bei der Selektion für kurzstrohige, moderne Weizensorten während der Grünen Revolution in den 1950er und 60er Jahren gegen das Resistenz-vermittelnde *Lr67res*-Allel selektiert, obwohl es eine außerordentlich hohe und stabile

Breitenwirksamkeit gegen biotrophe und hemibiotrophe Pilze vermittelt (Moore et al., 2015). Aus dem gleichen genetischen Grund ist es auch weiterhin sehr unwahrscheinlich, diese Entkopplung mittels Rekombination im Rahmen konventioneller Kreuzungszüchtung zu erreichen, um die *Lr67*-basierte Resistenz auch in aktuellem, kurzstrohigen Weizen nutzen zu können.

1.7. Zuckertransport und STP13-Funktion in Pflanzen

Zucker sind die Hauptprodukte der Fotosynthese und in den meisten Pflanzen ist Saccharose die wichtigste Transporteinheit für fotosynthetisch fixierten Kohlenstoff (Büttner, 2010; Pommerrenig et al., 2020). Zucker werden von den fotosynthetisch-aktiven Organen (*Source*) über das Phloem zu fotosynthetisch-inaktiven Organen (*Sink*) transportiert, die auf eine externe Zuckerzufuhr angewiesen sind (Büttner, 2010). Drei Hauptgruppen von spezialisierten Zuckertransportern spielen bei der Verteilung von Zuckern in der Pflanze eine entscheidende Rolle: die SWEETs (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters*), die SUTs (*Sucrose Transporters*) und die STPs (Eom et al., 2015; Skoppek et al., 2021). Die SWEET-Proteine haben typischerweise sieben Transmembrandomänen und transportieren verschiedene Substrate, während die SUT- und STP-Zuckertransporter zu der Major-Facilitator-Superfamilie (MFS) gehören und in der Regel 12 Transmembrandomänen aufweisen (Skoppek et al., 2021). SWEETs transportieren Saccharose aus den Mesophylzellen in die Zellwand, von wo aus SUTs Saccharose in das Phloem für den Ferntransport laden (Eom et al., 2015). An den *Sink*-Organen kann Zucker entweder direkt durch Plasmodesmata in die Zellen eintreten oder es findet eine aktive Aufnahme über Zuckertransporter statt (Büttner, 2010). STPs sind hochaffine Zucker-/Protonsymporter und zumeist in der Plasmamembran von *Sink*-Zellen lokalisiert, um Hexosen aus dem Zellwandraum in die Zellen zu transportieren. Über das Phloem transportierte Saccharose wird zum Beispiel durch die Zellwand-Invertase (Cell wall invertase; cwINV) hydrolytisch zu Hexosen/Monosacchariden (Glukose und Fruktose) gespalten, die als direkte Substrate für die STPs dienen (Pommerrenig et al., 2020). Huai et al. (2020) haben anhand von qRT-PCRs gezeigt, dass die drei *Lr67*-Homeoallele ubiquitär in der Pflanze exprimiert werden, mit den mit Abstand höchsten Transkriptabundanz in den Blättern. Alle drei vorgestellten Zuckertransportfamilien sind für die Pflanze wichtig zur Regulierung von zellulären und apoplastischen Zuckerkonzentrationen. Die Regulierung von Zucker ist nicht nur wichtig für die Verteilung innerhalb der Pflanze, sondern auch hinsichtlich der Tatsache, dass sich

biotrophe Pflanzenpathogene insbesondere von Zuckern ernähren. Viele Pathogene infizieren gezielt die nährstoffreichen Nischen des Pflanzengewebes und einige manipulieren direkt den Zuckertransport, um ihren Zugang zu Kohlenhydraten zu verbessern (Dodds und Lagudah, 2016). Pflanzen hingegen können den Zuckertransport regulieren und somit den Pathogenen ihre Nahrungsgrundlage entziehen und deren Ausbreitung verhindern oder reduzieren (Abbildung 10; Yamada et al., 2016). In Folge einer Pathogeninfektion werden *Source*-Organe zu lokalen *Sink*-Organen indem Pathogene aktiv Zuckertransporter beeinflussen, um zum Beispiel über die SWEET-Transporter die apoplastische Zuckerkonzentration zu erhöhen (zusammengefasst in Pommerrenig et al., 2020). Außerdem sind Zucker nicht nur wichtige Metabolite sondern auch Signalmoleküle in den Pflanzen, die die Expression von Genen beeinflussen und verschiedene zelluläre Reaktionen hervorrufen können (Pommerrenig et al., 2020). In verschiedenen Arten wurde gezeigt, dass die Expression von *Stp13* in Folge von biotischem und abiotischem Stress hochreguliert wird, was darauf hindeutet, dass *Stp13* Teil der allgemeinen Stressreaktion in Pflanzen ist. In der Promotorregion des *Stp13*-Gens der Weinrebe (*Vitis vinifera*) wurden cis-regulatorische Elemente (CREs) entdeckt, die typischer Weise in Abscisinsäure (*Abscisic acid*, ABA)-regulierten Genen zu finden sind. Daraufhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass *Stp13* u.a. über die ABA-Signaltransduktion reguliert wird (Hayes et al., 2010). Auch in der 5'-untranslatierten Region (UTR) von *HvStp13* wurden cis-regulatorische Elemente, wie *ABA-responsive elements* (ABREs) und Bindestellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren (W-Box) gefunden (Skoppek et al., 2021). In *Arabidopsis*, *Medicago truncatula*, Weizen und Gerste wurde gezeigt, dass die Expression von *Stp13* unter anderem durch ABA hochreguliert wird (Yamada et al., 2011; Gupta et al., 2021; Huai et al., 2020; Milne et al., 2019). Aber auch durch andere Pflanzenhormone wie Ethylen, Jasmonsäuremethylester und Salicylsäure wird die *Lr67*-Expression hochreguliert (Huai et al., 2020). Es wird vermutet, dass STP13 unter Stressbedingungen für die Aufnahme von Zucker aus umliegenden geschädigten Zellen zuständig ist (Yamada et al., 2011). Dies stärkt zum einen die Abwehrreaktion der benachbarten Zellen, zum anderen wird die Verfügbarkeit von Nährstoffen für das Pathogen begrenzt (Milne et al., 2019). Zudem wurde in *Arabidopsis* gezeigt, dass die Transporteraktivität von STP13 über eine Phosphorylierung des Threonins 485 erhöht wird (Nørholm et al., 2006; Yamada et al., 2016). Neben der in dieser Arbeit behandelten *Lr67/Stp13*-vermittelten Resistenz gegen Rost- und Mehltaupilze, spielt STP13 ebenfalls eine Rolle bei der Abwehr von *Botrytis cinerea* und

Pseudomonas in *Arabidopsis* und Mehltau in *Medicago truncatula* (Lemonnier et al., 2014; Yamada et al., 2016; Gupta et al., 2021). Bei nekrotrophen Pathogenen in *Arabidopsis* erhöhte eine Überexpression von *Stp13* die Resistenz, während *stp13*-Knock-outs die Anfälligkeit für diese Pathogene erhöhte (Lemonnier et al., 2014; Yamada et al., 2016). Im Gegensatz dazu entsteht durch die *Stp13*-vermittelte Inhibition des Zuckertransports eine Resistenz gegen biotrophe Pathogene (Moore et al., 2015; Milne et al., 2019; Huai et al., 2020; Gupta et al., 2021; Skoppek et al., 2021).

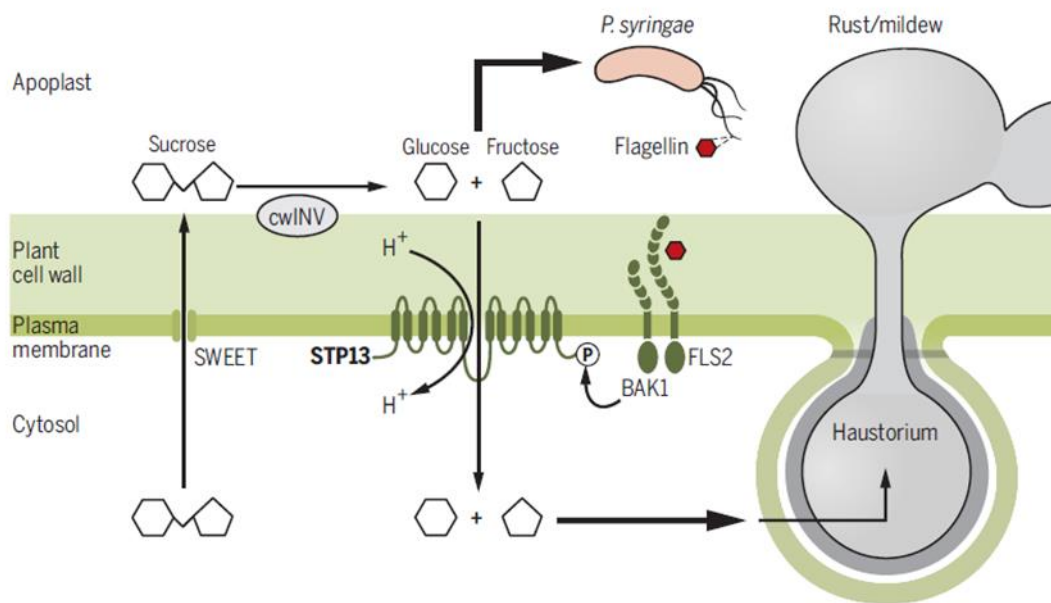


Abbildung 10: Wettkampf um den Zucker Saccharose wird mittels der SWEET-Transporter aus den Zellen in den extrazellulären Raum exportiert um zu anderen Pflanzenteilen transportiert zu werden. Saccharose wird durch die Zellwand-Invertase (cwINV) zu Hexosen (Glukose und Fruktose) gespalten. Diese können über den Zuckertransporter STP13 in die Zelle importiert werden. Manche Pathogene, wie das Bakterium *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*), benötigen apoplastischen Zucker. Jedoch haben Pflanzen einen Erkennungsrezeptor für das bakterielle Flagellin (FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) Rezeptor-Kinase). Durch die Interaktion mit der BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-assoziierten Rezeptor-Kinase 1 (BAK1) wird STP13 phosphoryliert, was zu einem erhöhten Zuckertransport in die Zellen durch STP13 führt. Rost- und Mehltaupilze bilden Haustorien, um Zugang zu Hexosen aus dem Inneren der Pflanzen Zellen zu gelangen. Abbildung aus Dodds und Lagudah, 2016

1.8. Zielstellungen dieser Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit waren die Etablierung eines modularen Vektorsystems für RNA-geleitete Endonukleasen und die exemplarische Anwendung dieses Systems für die Etablierung einer *Lr67*-basierten Resistenz in Weizen und Gerste. Zur Erreichung des ersten Ziels sollten Elemente aus vorvalidierten gRNA/Cas9-Vektoren für die Klonierung des als CasCADE bezeichneten Vektorsystems verwendet werden. Alle verwendeten Fragmente sollten dabei für das Prinzip der Golden-Gate-Klonierung angepasst werden. Die funktionelle Überprüfung repräsentativer Vektorvarianten sollte zunächst anhand von transienter Expression erfolgen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die Vektoren des zuvor validierten CasCADE-Systems für die Erstellung von gRNA/*cas9*-Expressionsvektoren für die gezielte Mutagenese von *Lr67* bzw. *Stp13* in Weizen und Gerste verwendet werden. Dafür wurden verschiedene Zielmotive ausgewählt, um zum einen Mutationen möglichst nah an der Position des bekannten, Resistenz-vermittelnden SNPs zu induzieren und zum anderen neue, putativ Resistenz-vermittelnde Mutationen an anderen Positionen innerhalb von *Lr67* bzw. *Stp13* zu erzeugen. Stabil-transformierte Weizen- und Gerstenpflanzen wurden generiert und auf Mutationen im *Stp13*-Gen analysiert. Zudem sollte die Vererbung von entstandenen Mutationen in die nächste Generation überprüft werden. Mit homozygot-mutierten Pflanzen war vorgesehen erste Resistenztests durchzuführen, um zu überprüfen, ob die erzeugten Mutationen zu Resistenzen gegen Braunrostpilze führen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Ambion (Waltham, MA, USA), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland), BRAND GmbH + Co. KG (Wertheim, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Niederlande), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland), Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), Pall Corporation (Port Washington, NY, USA), Roche (Mannheim, Deutschland), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chemikalien oder Materialien, die von anderen Firmen bezogen wurden, wurden im Text gesondert vermerkt.

2.1.2. Enzyme

Die Restriktionsenzyme und T4-DNA-Ligase für die *Golden-Gate*-Klonierungen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB; Ipswich, MA, USA) bezogen. Alle anderen Enzyme stammen von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Die Enzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet.

2.1.3. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Planegg, Deutschland) und Biologio (Nijmegen, Niederlande) synthetisiert. Arbeitslösungen von 10 μ M wurden hergestellt.

Alle verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle A1 im Anhang aufgeführt.

2.1.4. Reaktionskits

Die in dieser Arbeit verwendeten Reaktionskits sind in Tabelle 2 angegeben. Alle Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Reaktionskits

Kit	Verwendung	Firma
GeneJET Plasmid-Miniprep-Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
ZymoPURE II Plasmid-Midiprep-Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	Zymo Research (Irvine, CA, USA)
GeneJET Gel-Extraktions-Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
GeneJET PCR-Aufreinigungs-Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

2.1.5. Größenstandard

Für die Bestimmung von DNA-Fragmentgrößen in Agarosegelen wurden die GeneRuler™ 1 kb Plus und GeneRuler™ 100 bp Plus DNA-Leitern von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet.

2.1.6. Pflanzenmaterial

Die Gerstenlinie ‚Golden Promise‘ und die Weizenlinien ‚Bobwhite‘ und ‚Taifun‘ dienten als Donormaterial für die Transformationsexperimente. Die Gerstenlinie ‚Großklapprige‘ diente als Positivkontrolle für die Infektion mit dem Rostpilz *Puccinia hordei*. Die Pflanzen wurden wie in Hensel et al. (2009) beschrieben kultiviert.

2.1.7. Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Organismus	Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	DNA Cloning Service (Hamburg, Deutschland)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> *	AGL-1	C58 recA (rif R/carb R) Ti pTiBo542ΔT-DNA (strep R)	Intact Genomics (St. Louis, MO, USA)

* Zur Vereinfachung wird in der vorliegenden Arbeit die traditionelle binomiale Bezeichnung dieser Bakterien verwendet, wohl wissend, dass dadurch die biologische Wirklichkeit nicht auf beste Weise reflektiert wird. Während die taxonomische Einstufung des betreffenden Artenkomplexes einer noch hohen Dynamik unterliegt, ist die derzeit korrekte taxonomische Bezeichnung der hier verwendeten Agrobakterien umfassenden Art *Agrobacterium fabrum* (Lasalle et al., 2011; Huo et al., 2019; De Saeger et al., 2021).

2.1.8. Antibiotika

Alle Antibiotika-Stammlösungen bis auf Rifampicin wurden mit ddH₂O angesetzt. Rifampicin wurde in DMSO gelöst.

Tabelle 4: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml	100 µg/ml
Rifampicin	10 mg/ml	50 µg/ml
Carbenicillin	100 mg/ml	100 µg/ml

2.1.9. Medien und Puffer

2.1.9.1. Medien für die Kultivierung von *E. coli*

LB Medium (flüssig; Bertani, 1951)

10 g/L Natriumchlorid
10 g/L Trypton
5 g/L Hefeextrakt
→ pH: 7,0
→ autoklavieren

LB Medium (fest)

+ 10 g/L Agar

SOC Medium (modifiziert nach Hanahan, 1983)

20,0 g/L Trypton
5,0 g/L Hefeextrakt
2,5 ml/L KCl (1M)
10,0 ml/L MgSO₄ (1M)
10,0 ml/L MgCl₂ (1M)
20,0 ml/L Glukose (1M)
→ autoklavieren

2.1.9.2. Medien für die Kultivierung von *A. tumefaciens*

MG/L Medium (flüssig; Garfinkel und Nester, 1980)

5g/L Mannitol
1g/L L-Glutaminsäure
250mg/L KH₂PO₄
100mg/L NaCl
100mg/L MgSO₄
1µg/L Biotin
5g/L Trypton
2,5g/L Hefeextrakt
→ pH: 7,0
→ autoklavieren

MG/L Medium (fest)

+ 10 g/L Agar

2.1.9.3. Medien für die Transformation und Regeneration von Gerste

Alle Medien wurden nach Kumlehn et al. (2006), Hensel et al. (2009) und Marthe et al. (2015) hergestellt.

Co-Kultivierungsmedium (flüssig)

4,3 g/L MS Basales Salzgemisch
1 g/L Casein Hydrolysat
0,69 g/L Prolin
0,25 g/L Myo-Inositol
30 g/L Maltose·H₂O
1 ml/L Dicamba (2,5 g/L)
1 ml/L Thiamin·HCl (1 g/L)
800 mg/L L-Cystein
→ pH: 5,8
→ steril filtrieren
500 µL/L Acetosyringon (1 M)

Kallus-Induktionsmedium (fest)

4,3 g/L MS Basales Salzgemisch
1 g/L Casein Hydrolysat
0,69 g/L Prolin
0,25 g/L Myo-Inositol
30 g/L Maltose·H₂O
1 ml/L Dicamba (2,5 g/L)
1 ml/L Thiamin·HCl (1 g/L)
0,2 mL/L CuSO₄·5H₂O (25mM)
→ pH: 5,8
1 ml/L Hygromycin (50 g/L)
1 ml/L Timentin (150 g/L)
→ steril filtrieren
→ 1 Teil Lösung mit 3 Teilen Phytigel (0.4 % w/v) mischen

Regenerationsmedium (fest)

50 ml/L K4N Makro-Mineralien (20x)
1 ml/L NaFe-EDTA (75 mM)
1 ml/L K Mikro-Mineralien (1.000x)
1 ml/L Vitamin B5
1 ml/L 6-BAP (1 mM)
4 ml/L L-Glutamin (0,25 M)
100 ml/L Maltose (1 M)
196 µL/L CuSO₄·5H₂O (25 mM)
→ pH: 5,8
→ steril filtrieren
→ 1 Teil Lösung mit 3 Teilen Phytigel (0.4 % w/v) mischen

K4N Makro-Mineralien (20x)

6,4 g/L NH₄NO₃
72,8 g/L KNO₃
6,8 g/L KH₂PO₄
8,82 g/L CaCl₂·2H₂O
4,92 g/L MgSO₄·7H₂O
→ steril filtrieren

K Mikro-Mineralien (1.000x)

84 mg/L MnSO₄·H₂O
31 mg/L H₃BO₃
72 mg/L ZnSO₄·7H₂O
1,2 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O
0,25 mg/L CuSO₄·5H₂O
0,24 mg/L CoCl₂·6H₂O
1,7 mg/L KI
→ steril filtrieren

2.1.9.4. Medien für die Transformation und Regeneration von Weizen

Alle Medien wurden nach Kumlehn et al. (2006), Hensel et al. (2009) und Marthe et al. (2015) hergestellt.

Vorkulturmedium (fest)

4,4 g/L MS Basales Salzgemisch
1 g/L Casein Hydrolysat
0,5 g/L Glutamin
0,5 ml/L CuSO₄·5H₂O (10mM)
40 g/L Maltose·H₂O
8mg/L Dicamba
→ pH: 5,8
→ steril filtrieren
3,5 g/L Phytigel

Osmotikummedium (fest)

4,4 g/L MS Basales Salzgemisch
1 g/L Casein Hydrolysat
0,5 g/L Glutamin
0,5 ml/L CuSO₄·5H₂O (10mM)
40 g/L Maltose·H₂O
8mg/L Dicamba
100 g/L Saccharose
→ pH: 5,8
→ steril filtrieren
3,5 g/L Phytigel

Co-Kultivierungsmedium (flüssig)

2,65 g/L MS (ohne NH_4NO_3)
0,165 g/L NH_4NO_3
0,1 g/L Casein Hydrolysat
0,5 ml/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10mM)
1 ml/L B5-Vitamine (1.000x)
2 mg/L 2,4-D
2 g/L MES
800 mg/L L-Cystein
→ pH: 5,8
→ steril filtrieren
500 μL /L Acetosyringon (1 M)

Regenerationsmedium I +II (fest)

50 ml/L K4N Makro-Mineralien (20x, s. Gerste)
1 ml/L NaFe-EDTA (75 mM)
1 ml/L K Mikro-Mineralien (1.000x, s. Gerste)
1 ml/L Vitamin B5 (1.000x)
1 ml/L 6-BAP (1 mM)
4 ml/L L-Glutamin (0,25 M)
100 ml/L Maltose (1 M)
490 μL /L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10 mM)
→ pH: 5,8
→ steril filtrieren
150 mg/L Timentin
25 mg Hygromycin
3,5 g/L Phytigel

Kallus-Induktionsmedium (fest)

4,4 g/L MS Basales Salzgemisch
40 g/L Maltose- H_2O
0,5 g/L Glutamin
0,1 g/L Casein Hydrolysat
0,5 ml/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10mM)
2 mg/L 2,4-D
0,5 g/L MES
→ pH: 5,8
150 mg/L Timentin
0, 20 oder 50 mg Hygromycin
→ steril filtrieren
3,5 g/L Phytigel

Regenerationsmedium III (fest)

33,34 ml/L K4N Makro-Mineralien (20x, s. Gerste)
0,67 ml/L NaFe-EDTA (75 mM)
0,67 ml/L K Mikro-Mineralien (1.000x, s. Gerste)
0,67 ml/L Vitamin B5 (1.000x)
2,67 ml/L L-Glutamin (0,25 M)
66,67 ml/L Maltose (1 M)
330 μL /L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10 mM)
→ pH: 5,8
→ steril filtrieren
100 mg/L Timentin
20 mg Hygromycin
3,5 g/L Phytigel

2.1.9.5. Puffer für die *Calcofluor White*-Färbung

Alle Puffer wurden nach Rohringer (1977) und Serfling et al. (2016) hergestellt.

Lactophenol/Ethanol 1:2 (v/v)

230 g Phenol
230 ml Glycerin
115 ml Milchsäure
1104 ml Ethanol (vergällt)

Calcofluor White (0,2 %)

2 g Uvitex2B
1 L H_2O dest

Entfärbelösung

750 ml Ethanol (vergällt)
250 ml Chloroform
10 ml Trichloressigsäure (15 %)

2.1.9.6. Puffer für die elektrophoretische Auftrennung von DNA

5x TBE (Peacock und Dingman, 1968)

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

2.1.9.7. Puffer für die Extraktion von genomischer DNA

96er Format (Milner et al., 2019):

Extraktionspuffer (Pallotta et al., 2000)

GTC-Puffer

118,2 g/L Guanidinthiocyanat (GTC)
116,8 g/L NaCl
15 ml/L NaAc (1M, pH 6,0)
1 ml Tween 20
Steriles ddH₂O

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

Wasch-Puffer

10 ml/L NaCl (5M)
10 ml/L Tris/HCl (1M, pH 8,0)
2 ml/L EDTA (0,5 M)
700 ml/L Ethanol
Steriles ddH₂O

TElight Elutionspuffer

0,2 ml/L EDTA (0,5 M)
10 ml/L Tris/HCl (1M, pH 8,0)
→ autoklavieren

2.1.10. Verwendete und erstellte Vektoren

2.1.10.1. CasCADE-Vektoren

Für die Verwendung in der Golden Gate Klonierung wurden basierend auf dem pUC57 (ein Derivat vom pUC19; Perron et al., 1985) zwei Backbone-Vektoren erstellt, die die Grundlage aller weiteren Vektoren darstellen. Die beiden Backbone-Vektoren haben eine reduzierte Größe (ca. 2000 bp) mit nur wenigen Erkennungssequenzen für konventionelle Restriktionsenzyme (außerhalb der multiplen Klonierungsstelle) und gar keine Erkennungssequenzen für Typ-II-Restriktionsenzyme, die in der *Golden-Gate*-Klonierung verwendet werden. Der Vektor pSH163 wurde zu einem früheren Zeitpunkt in der Arbeitsgruppe kloniert und als Grundlage für das modulare Vektorsystem zur Verfügung gestellt. Die Hauptmerkmale von pSH163 sind ein Ampicillin-Resistenzgen, eine multiple Klonierungsstelle (*Multiple cloning site, MCS*) und ein chromosomaler Replikationsursprung für Bakterien (*origin of chromosomal replication, oriC*). In den zweiten Backbone-Vektor pIK18 wurde anstatt des Ampicillin-Resistenzgens ein Spectinomycin-Resistenzgen eingefügt. Dafür wurde ein Teil des pSH163 mit den Primern IK1 und IK2 amplifiziert. Mit den Primern IK3, IK4, IK5 und IK6 wurde aus dem Vektor pSH121 (GenBank: MW145140.1; Gerasimova et al., 2019) die Spectinomycin-Resistenzkassette amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* (Gibson et al., 2009; s. Abschnitt 2.2.7.) die beiden Amplifikate zur Erstellung von pIK18 zusammengefügt.

2.1.10.1.1. Klonierung der Generischen gRNA-Modulvektoren für Monokotyledonen

Die Fragmente für die gRNA-Module mit dem *Oryza sativa* U3-Promotor (*OsU3*; pIK1-4) und dem *Triticum aestivum* U6-Promotor (*TaU6*; pIK5-8) wurden von GenScript (Piscataway, NJ, USA) synthetisiert und in pSH163 eingefügt. Alle Generischen gRNA-Modulvektoren enthalten ein transkriptionelles Terminationssignal bestehend aus sieben Thymidin-Nukleotiden (*T-Stretch*; Shan et al., 2013). Mit den Primern IK9 und IK10 wurde die *lacZ* (β -Galactosidase) -Expressionskassette aus pUC57 amplifiziert und mittels der gleichen Primer das Fragment mit NotI- und NcoI-Erkennungssequenzen flankiert. Anschließend wurde in alle Generischen gRNA-Modulvektoren das *lacZ*-Fragment zwischen den Promotor und das gRNA-*Scaffold* mittels NotI und NcoI kloniert. Das Einfügen einer Zielmotiv-spezifischen, i.d.R. 20 Nukleotid-langen gRNA-Sequenz ist über einen *Golden-Gate*-Schritt mit dem Enzym BsaI möglich. In diesem Schritt wird die *lacZ*-Kassette herausgeschnitten und die Auswahl der richtigen Klone kann über eine Blau-Weiß-Selektion erfolgen. Alle gRNA-Fragmente sind mit Esp3I-Erkennungssequenzen flankiert und die entstehenden Überhänge sind so designt, dass sich automatisch eine richtige Anordnung der Fragmente in einer *Golden-Gate*-Reaktion ergibt.

2.1.10.1.2. Klonierung der Generischen gRNA-Modulvektoren für Dikotyledonen

Die gRNA-Fragmente mit dem *Arabidopsis thaliana* U6-26 (*AtU6*) -Promotor wurden aus pSI57 (Sindy Chamas, zu einem früheren Zeitpunkt in der Arbeitsgruppe kloniert) mittels der Primer IK136, IK137, IK138, IK139, IK140, IK141, IK142 und IK143 amplifiziert. Die verschiedenen Primerkombinationen sind analog zu den gRNA-Modulen für Monokotyledonen mit Esp3I-Erkennungssequenzen und verschiedenen Überhängen für die *Golden-Gate*-Klonierung zur Assemblierung der vier verschiedenen Module ausgestattet. Die amplifizierten Fragmente wurden mittels *Gibson Assembly* in pSH163 kloniert (pIK75-78). Das Einfügen der Zielmotiv-spezifischen 20 Nukleotid-langen gRNA-Sequenz kann über einen *Golden-Gate*-Schritt mit dem Enzym BbsI erfolgen.

2.1.10.1.3. Klonierung der Promotor-, Endonuklease und Terminator-Module

Das Vektorset enthält für die Expression von *cas9* einen *Zea mays Polyubiquitin 1*-Promotor (*ZmUbi1*), einen doppelt-verstärkten Blumenkohlmosaikvirus (*doubled-enhanced cauliflower mosaic virus*, CaMV) *35S*-Promotor (*2x35S*) und einen *Petroselinum crispum Ubiquitin-4-2*-Promotor (*PcUbi4-2*). Der *ZmUbi1*-Promotor (pIK74) wurde mit den Primern IK134 und IK135 aus dem Vektor pUbiFull-AB-M (Weiß

et al., 2022) amplifiziert und der *2x35S*-Promotor (pIK12) mit den Primern IK13 und IK14 aus dem Vektor p6i-2x35S-TE9 (DNA-Cloning-Service, Hamburg). Der *PcUbi4-2*-Promotor (pIK79) wurde mit den Primern IK144 und IK145 aus dem Vektor pDE-eCas9 (Fauser et al., 2014) amplifiziert und jedes Promotor-Amplikon mittels *Gibson Assembly* in den linearisierten Vektor pSH163 (BamHI und EcoRI) kloniert. Mit den jeweiligen Primern wurden an jeder Seite eines Promotors SapI-Erkennungssequenzen mit unterschiedlichen Überhängen angefügt.

Für die Expression in Monokotyledonen wurde eine für Mais Codon-optimierte *Spcas9* (*cZm-cas9*; Gerasimova et al., 2019) und davon abgeleitete Derivate verwendet. Für die Verwendung in Dikotylen wurde eine für *Arabidopsis* Codon-optimierte *Spcas9* (*cAt-cas9*; Fauser et al., 2014) kloniert. Die *cZm-cas9* wurde mit den Primern IK15, IK16, IK17, IK18, IK19 und IK20 aus dem Vektor pSH121 amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in den linearisierten pSH163 (BamHI und EcoRI) kloniert (pIK14). Die Primer wurden so gewählt, dass unerwünschte BsaI-Erkennungssequenzen innerhalb der *cas9* eliminiert wurden, ohne dass es zu einer Veränderung der Aminosäureabfolge kam. Mit den Primern IK43, IK44, IK45 und IK46 wurde aus dem Vektor pIK14 ein *cZm-cas9* D10A-Nickase (*cZm-cas9-D10A*) Fragment amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in den linearisierten Vektor pSH163 (BamHI und EcoRI) kloniert (pIK21). Die *cAt-cas9* wurde mit den Primern IK147 und IK148 aus dem Vektor pDE-eCas9 amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in den linearisierten Vektor pSH163 (BamHI und EcoRI) kloniert (pIK81). Mit den jeweiligen äußeren Primern wurden an jeder Seite einer Endonuklease-Variante SapI-Erkennungssequenzen mit unterschiedlichen Überhängen angefügt. Für die artifizielle xCas9 (Hu et al., 2018) wurde ein Fragment basierend auf der *cZm-cas9* von GenScript synthetisiert und mit den Primern IK15, IK130, IK131, IK132, IK133 und IK20 weitere Fragmente der *cZm-cas9* aus dem Vektor pIK14 amplifiziert. Alle Fragmente wurden mittels *Gibson Assembly* in das linearisierte Plasmid pSH163 (BamHI und EcoRI) kloniert (pIK73). Für die artifizielle Cas9-NG (Nishimasu et al., 2018) wurde ein Fragment basierend auf der *cZm-cas9* von GenScript synthetisiert und von einem Kollegen der Arbeitsgruppe in pSH163 kloniert (pSH248). Ebenso wurden das Adenin-Deaminase (ADA) -Konstrukt (pSH250) und das Cytidin-Deaminase (CDA) -Konstrukt (pSH307) innerhalb der Arbeitsgruppe kloniert. Die Fragmente der Adenin-Deaminase (Li et al. 2018) und Cytidin-Deaminase (Nishida et al., 2016) wurden synthetisiert (Genewiz/Azenta Life Sciences, Chelmsford, MA, USA und Twist Bioscience, San Francisco, CA, USA)

und mit der *cZm-cas9-D10A* zu den finalen Konstrukten mittels *Gibson Assembly* kloniert.

Ein translationales GFP-Fusionselement wurde mit den Primern IK23 und IK24 aus dem Vektor pYF133 (Fang et al., 2002) amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in pSH163 (BamHI und EcoRI-verdaut) kloniert (pIK15).

Ein *nopaline synthase*-Terminator (*nos-t*) wurde mit den Primern IK25 und IK26 aus dem zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe erstellten Vektor pSH179 amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in den linearisierten Vektor pSH163 (BamHI und EcoRI) kloniert (pIK16, pIK58). Ein Doppelterminator (Beyene et al., 2011), bestehend aus Blumenkohlmosaikvirus *35S*-Terminator und *nopaline synthase*-Terminator (*35S-t+nos-t*), wurde von GenScript synthetisiert und mittels *Gibson Assembly* in pSH163 (BamHI und EcoRI-verdaut) kloniert (pIK82). Alle Terminator-Module wurden mit SapI-Erkennungssequenzen flankiert.

2.1.10.1.4. Klonierung der Assemblierungsvektoren

Für den Generischen 4-gRNA-Assemblierungsvektor pIK19 wurde mit den Primern IK35, IK36, IK37, IK38, IK39 und IK40 das zytotoxische Gen *ccdB* (*control of cell death B*) aus pDE-eCas9 amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in das linearisierte Plasmid pIK18 (EcoRV) kloniert. Mit den äußeren Primern IK35 und IK40 wurden an jeder Seite des Fragments jeweils eine Esp3I- und BsaI-Erkennungssequenz eingefügt. Für die drei Generischen gRNA-Assemblierungsvektoren pIK89 (1-gRNA), pIK60 (2-gRNA) und pIK61 (3-gRNA) wurde mit den jeweiligen Primern IK35, IK155, IK123 und IK124 die *ccdB*-Kassette aus pIK19 amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in das linearisierte Plasmid pIK18 (EcoRV) kloniert. Wie auch beim pIK19 wurde mit den äußeren Primern an jeder Seite des Fragments jeweils eine Esp3I- und BsaI-Erkennungssequenz eingefügt. Für den Generischen Endonuklease-Assemblierungsvektor pIK20 wurde mit den Primern IK36, IK37, IK38, IK39, IK41 und IK42 die *ccdB*-Kassette aus dem pDE-eCas9 amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in den linearisierten Vektor pIK18 (EcoRV) kloniert. Mit den äußeren Primern IK41 und IK42 wurden an jeder Seite des Fragments jeweils eine SapI- und BsaI-Erkennungssequenz eingefügt. Die intermediären Endonuklease-Vektoren pIK83, pIK84 und pIK137 enthalten den *ZmUbi1*-Promotor, den Doppelterminator und die *cZm-cas9*, die *cZm-xcas9* oder die *cZm-cas9-NG*, respektive. Der intermediäre Endonuklease-Vektor pRB20 enthält den *PcUbi4-2*-Promotor, die *cAt-cas9* und den Doppelterminator.

Mit dem Generischen Auxiliären Modulvektor pIK155 wird im finalen Assemblierungsschritt eine multiple Klonierungsstelle (MCS) eingefügt. Hierfür wurde mit den Primern IK336 und IK53 die MCS aus pUC57 amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in den linearisierten Vektor pIK18 (EcoRI und HindIII) kloniert. Somit dient das pIK155 Modul als auxiliäre Einheit, in die nach Belieben ein funktionelles Element eingesetzt werden kann. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden dazu zwei Marker-Module mit GFP- bzw. mCherry-Expression basierend auf dem Generischen Auxiliären Modulvektor pIK155 kloniert (pSH290, pAE68).

Für den Generischen Transformationsvektor pIK48 wurde mit den Primern IK121 und IK122 die *ccdB*-Kassette aus dem pIK19 amplifiziert und mittels *Gibson Assembly* in den linearisierten Vektor pSH163 (BamHI und EcoRI) kloniert. Mit den Primern wurde an jeder Seite der *ccdB*-Kassette jeweils eine BsaI- und eine SfiI-Erkennungssequenz eingefügt. Die *Ready-to-use* Transformationsvektoren pIK95 und pIK96 bestehen respektive aus dem *OsU3*- oder *TaU6*-Promotor, dem *gRNA-Scaffold*, dem *ZmUbi1*-Promotor, der *cZm-cas9* und dem Doppelterminator. In diese Vektoren können Zielmotiv-spezifische gRNA-Fragmente über einen *Golden-Gate*-Schritt eingefügt werden.

2.1.10.2. Vektoren zur gezielten Mutagenese von *HvLox1*, *TaLr67* und *HvStp13*

Die *HvLox1* (Lipoxygenase1) -Konstrukte 1 bis 4 wurden wie in dem Klonierungs-Protokoll für das CasCADE-System beschrieben (Kapitel 2.2.16.) erstellt. Ebenso wurden die *Lr67*-Konstrukte 1 bis 4 und die *HvStp13*-Konstrukte 1 bis 3 anhand des Protokolls kloniert.

Die *Lr67*-gRNAs 1 bis 7 wurden jeweils einzeln in pSH179 (BsaI-verdaut) kloniert und die daraus resultierenden Vektoren pIK24 bis pIK30 erstellt.

2.1.10.3. Zielvektoren

Die Ziel-Konstrukte 1 und 2 für *HvLox1* und pIK32 bis pIK38 für *Lr67* wurden für die transiente Co-Expression mit einem gRNA/cas9-Expressionsvektor kloniert, um die Mutationseffizienz verwendeter gRNAs zu testen. Als Grundlage für die Klonierung der Zielvektoren diente der generische Vektor pNB1 (GenBank: KU705395), welcher ein dysfunktionales *yfp*-Reportergen unter der Kontrolle des *2x35S*-Promotors trägt. Des Weiteren enthält der Vektor das Legumin B4-Signalpeptid (LeB4) aus *Vicia faba* sowie ein KDEL-Motiv am C-terminalen Ende des *yfp*, für die Retention des Proteins im endoplasmatischen Retikulum. Mit Hilfe der BamHI/EcoRI-Klonierungsstelle wurde das jeweilige Zielmotiv-Fragment inklusive des PAMs zwischen LeB4 und *yfp* integriert,

sodass bei gezielter Mutagenese der translationale Leserahmen des Reportergens wiederhergestellt und damit die Effizienz der Mutagenese quantifiziert werden kann.

2.1.10.4. mCherry-Vektor

Der mCherry-Vektor (pNB2) wurde zur Normalisierung des biologischen Testsystems und somit für die Berechnung der Effizienz der gRNAs verwendet. Der Vektor wurde von einer ehemaligen Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe kloniert und stand für die Verwendung beim Partikelbeschuss zur Verfügung. Die Expressionskassette besteht aus einem *2x35S*-Promotor, einem *mCherry*-Gen und einem *nos*-Terminator.

2.1.10.5. Binärvektoren

Jede für die stabile Pflanzentransformation bestimmte gRNA/cas9-Expressionskassette wurde mit Hilfe der SfiI-Restriktionsschnittstellen in den binären Vektor p6i-2x35s-TE9 kloniert, welcher durch das enthaltene *Hygromycin-Phosphotransferase (hpt)*-Gen eine pflanzliche Resistenz gegen Hygromycin vermittelt. Das *hpt*-Gen ist unter der Kontrolle des *ZmUbi1*-Promotors und wird vom *Pisum sativum Rubisco small subunit E9*-Terminator (*E9-t*) terminiert. Die entstandenen Transformationsvektoren pIK24-p6i, pIK27-p6i, pIK28-p6i, pIK138, pIK139, pIK149, pIK150, pIK172, pIK173 und pIK191 wurden mittels Elektroschock in den *A. tumefaciens*-Stamm AGL1 integriert (siehe Kapitel 2.2.12.).

2.1.11. Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Verwendung	Firma
Clone Manager 9 Professional Edition	In-silico Klonierung, Design von Plasmiden und Oligonukleotiden	Scientific & Educational Software (Morrisville, NC, USA)
Unipro UGENE	Analyse von Sequenzierungsdaten	Unipro (Novosibirsk, Russland)
R	Auswertung von Sequenzdaten	Bell Laboratories (Murray Hill, NJ, USA)
Citavi 6	Literaturverwaltung	Swiss Academic Software (Wädenswil, Schweiz)
Microsoft Office 2016	Dokumentation	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)

2.1.12. Terminologie

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konventionen zur Schreibweise von Genen und deren Produkte sind in Tabelle 6 gelistet. Codierende Sequenzen werden im Text zum

Teil gleichlautend mit ihren Produkten (z.B. gRNA, Endonuklease etc.) bezeichnet, da die vollständigen Formulierungen ansonsten deutlich komplizierter und damit insgesamt weniger verständlich ausfallen würden. Die bei individuellen Genbezeichnungen verwendete Kursivschrift ist dabei ein Indikator, um zwischen Gen und Genprodukt zu unterscheiden.

Tabelle 6: Verwendete Nomenklaturen

Referenz	Art
Meinke und Koornneef, 1997	<i>Arabidopsis thaliana</i>
McIntosh et al., 2013	<i>Triticum aestivum</i>
Franckowiak und Lundqvist, 2010	<i>Hordeum vulgare</i>
Roberts et al., 2004	Restriktionsenzyme, Endonukleasen

2.2. Methoden

2.2.1. Extraktion genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Blättern von 1-2 Wochen alten Keimlingen extrahiert. Es wurde sowohl eine Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (26:24:1; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) -basierte Methode (Pallotta et al., 2000) als auch für große Probenumfänge eine zeitsparende AcroPrep™ Advance 96-well Filterplatte/GTC-NaCl-Methode (Milner et al., 2019) angewendet.

2.2.2. Extraktion von Plasmid-DNA

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* oder *A. tumefaciens* Zellen erfolgte unter Verwendung des GeneJET Plasmid-Miniprep-Kits von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) nach den Angaben des Herstellers. Für die Protoplastenexperimente wurde Plasmid-DNA im zweistelligen µg-Bereich benötigt und zu diesem Zweck das ZymoPURE II Plasmid-Midiprep-Kit von Zymo Research (Irvine, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion

DNA wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Dafür wurde entweder die GoTaq-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) oder die Q5-Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

Der Standard-Reaktionsansatz für eine 20 µl-Reaktion sah wie folgend aus:

Reaktionspuffer (5x)	4,0 µl
dNTPs (10µM)	0,4 µl
<i>Forward Primer</i> (10µM)	0,5 µl
<i>Reverse Primer</i> (10µM)	0,5 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
DNA	50-100 ng
Nuklease-freies Wasser	bis 20 µl

Das PCR-Programm kann in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren variieren. So bestimmt zum Beispiel die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments die Elongationszeit. Die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer wurde in Gradienten-PCRs ermittelt. Alle verwendeten PCR-Programme leiten sich von dem folgenden Standardprotokoll ab und wurden im Mastercycler® nexus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Initiale Denaturierung	95 °C für 5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95 °C für 30 s	
Hybridisierung	T _{opt} °C für 30 s	
Elongation	72 °C variabel	
Finale Elongation	72 °C für 5 min	
Pause	∞	

2.2.4. DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente und PCR-Produkte wurden in 0,8-2 %igen (w/v) Agarosegelen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Agarose wurde in 0,5x TBE-Puffer aufgekocht und für die Visualisierung dem flüssigen Agarosegel 1 µl/100 ml MIDORI Green Xtra (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) hinzugefügt. Als Laufpuffer für die Gelelektrophorese diente ebenfalls der 0,5x TBE-Puffer. Die Ergebnisse wurden mit dem UVP GelStudio von Analytik Jena GmbH (Jena, Deutschland) dokumentiert.

2.2.5. Aufreinigung von Nukleinsäuren aus PCR-Reaktionen und Agarosegelen

Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus PCR-Reaktionen und Agarosegelen wurde das GeneJET PCR-Aufreinigungs-Kit bzw. das GeneJET Gel-Extraktions-Kit von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von genomischer DNA, Plasmid-DNA und aufgereinigten PCR-Produkten wurde mit einem Nanodrop 2000 Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt.

2.2.7. *Gibson Assembly*

Mit Hilfe des kostenlosen und freiverfügbaren NEBuilder® Assembly Tools (<https://nebuilder.neb.com/#!/>) wurden überlappende Primer für die *Gibson Assembly*-Reaktion ausgewählt. Die zu klonierenden Fragmente wurden zunächst in einer Standard-PCR mit den spezifischen Gibson-Assembly-Primern amplifiziert und anschließend aus dem Agarosegel aufgereinigt. Die Gibson-Assembly-Reaktionen wurden mit dem NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.8. Restriktionsverdau

Genomische oder Plasmid-DNA wurde mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben verdaut. In der Regel wurde der Reaktionsansatz bei 37 °C für mindestens 30 min inkubiert. Abweichungen werden angegeben.

2.2.9. Ligation

Für die Ligation von zwei DNA-Fragmenten wurden T4 DNA Ligasen von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) und New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. In der Regel wurde der Ligationsansatz bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Abweichungen davon sind im jeweiligen Kontext angegeben.

2.2.10. *Golden-Gate*-Klonierung

Die *Golden-Gate*-Klonierung erlaubt den Zusammenbau von mehreren Fragmenten in nur einer Reaktion. Der Standard-Reaktionsansatz ist wie folgt:

Backbone-Vektor	15 ng
Inserts	1:3-1:7 (molares Verhältnis Vektor:Insert)
Enzym (NEB)	0,5 µl
T4 DNA Ligase (NEB)	0,5 µl
10 x Cut Smart Puffer	1,0 µl
ATP (10mM, NEB)	0,5 µl
H ₂ O	Bis 10 µl

Das im folgenden Schema dargestellte Standard-*Golden-Gate*-Programm wurde im Mastercycler® nexus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ausgeführt.

Restriktionsverdau	37 °C für 5 min	} 10 Zyklen
Ligation	22 °C für 10 min	
Finale Ligation	37 °C für 30 min	
Hitzeinaktivierung	75 °C für 15 min	
Pause	4 °C ∞	

2.2.11. Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und ca. 4 µl Plasmid-DNA in das Reaktionsgefäß mit 50 µl chemisch kompetenten Zellen pipettiert. Die Reaktion wurde vorsichtig gemischt und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 Sekunden bei 42 °C, gefolgt von einer Inkubation von 2 min auf Eis. 450 µl SOC-Medium wurden zugegeben und die transformierten Zellen eine Stunde lang bei 37 °C und 550 rpm inkubiert. 50-100 µl der Transformation wurde auf ein selektives LB-Medium ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Holzzahnstocher aufgenommen und in flüssiges LB-Medium (selektiv) überführt. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden für die Extraktion von Plasmid-DNA verwendet.

2.2.12. Transformation elektrokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und ca. 1-2 µl (100 ng) des Binärvektors wurde in das Reaktionsgefäß mit 50 µl elektrokompetenten Zellen pipettiert. Die Reaktion wurde vorsichtig gemischt und 2 Minuten lang auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde in eine vorgekühlte Küvette überführt und die Küvette in dem Bio-Rad Elektroporator (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) platziert. Der Elektroschock wurde bei 25 µF, 400 Ω und 2,5 kV durchgeführt. Anschließend wurde sofort 950 µl SOC-Medium hinzugefügt und die transformierten Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation bei 28 °C und 550 rpm für zwei Stunden. 30 µl des Transformationsansatzes wurden auf ein selektives MG/L-Medium ausgestrichen und die Platten für 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden mit einem sterilen Holzzahnstocher aufgenommen und in flüssiges MG/L-Medium (selektiv) überführt. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden für die Extraktion von Plasmid-DNA verwendet.

2.2.13. Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion ist eine einfache Methode zur Unterscheidung von Bakterienkolonien, die entweder einen Klonierungsvektor mit Insert oder einen leeren Klonierungsvektor enthalten. Die Methode basiert auf dem blauen Pigment, das sich bildet, wenn Beta-Galaktosidase (codiert durch das *lacZ*-Gen) die Hydrolyse des synthetischen Substrats X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-d-galaktosid) zu Galaktose und einem blauen Farbstoff (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo) katalysiert. Transformierte *E. coli*-Zellen wurden auf selektivem Medium ausgestrichen, auf dem

zuvor 40 µl Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; 0,1 M Stocklösung) und 40 µl X-Gal (20 mg/ml Stocklösung) verteilt wurden. Durch das IPTG wird der *lacZ*-Promotor aktiviert. Zellen, die einen leeren Klonierungsvektor und ein intaktes *lacZ*-Gen enthalten, bilden blaue Kolonien, während die Zellen, die einen Klonierungsvektor mit Insert und folglich ein zerstörtes bzw. entferntes *lacZ* enthalten, erscheinen als weiße Kolonien.

2.2.14. Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Holzzahnstocher aufgenommen und kurz in das jeweilige PCR-Reaktionsgefäß mit dem vorgelegten PCR-Reaktionsmix getaucht. Anschließend wurde die PCR gestartet.

2.2.15. Sequenzierung

2.2.15.1. Sanger-Sequenzierung

Zur Überprüfung von Vektorsequenzen oder zur Charakterisierung induzierter Mutationen in Pflanzen wurden Plasmid-DNA oder aufgereinigte PCR-Produkte von der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe der Programme Clone Manager 9 und Unipro UGENE ausgewertet.

2.2.15.2. Amplikon-Tiefensequenzierung

Zur Charakterisierung von induzierten Mutationen in Protoplasten oder in Pflanzen wurden etwa 150 bp der Zielregionen mittels spezifischer Primer amplifiziert. An die 5'-Enden der Primer wurden verschiedene Barcodes bestehend aus sechs Nukleotiden angefügt, die eine spätere Zuordnung der Sequenzen zu den Pflanzen erlaubte. Durch die Verwendung von verschiedenen Barcodes konnten bis zu 64 Pflanzen für eine Amplikon-Tiefensequenzierung gepoolt werden. Die Amplikon-Tiefensequenzierung wurde von der Firma Genewiz/ Azenta Life Sciences (Chelmsford, MA, USA) durchgeführt und die Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe eines in der Arbeitsgruppe entwickelten R-Skripts analysiert. Durch das R-Skript wurden die Sequenzdaten der Illumina MiSeq-Sequenzierung im FASTQ-Format den jeweiligen Barcodes zugeordnet und als alignierte Sequenzen im FASTA-Format ausgegeben. Diese konnten wiederum mit dem Programm Unipro UGENE ausgewertet werden.

2.2.16. CasCADE Klonierungsprotokoll

2.2.16.1. Klonierung von gRNA-Modulvektoren

Zunächst wird das individuelle Zielmotiv-spezifische 5'-Ende der gRNA entweder als Oligonukleotide synthetisiert oder mittels PCR amplifiziert. Dabei ist drauf zu achten, dass spezifische Überhänge angefügt werden, für die sich aus dem BsaI- bzw. BbsI-Verdau der Generischen gRNA-Modulvektoren komplementäre Gegenstücke ergeben. Für das *Forward*-Oligonukleotid muss der vier Nukleotid-lange Überhang passend zum Anschluss an den vorgesehenen RNA-Polymerase III (Pol III) -Promotor (Promotoren von *small nuclear RNA* (snRNA) -codierenden Genen) gewählt werden (TGGC für pIK1 bis pIK4, CTTG für pIK5 bis pIK8 und ATTG für pIK75 bis pIK78), während der mit dem gRNA-*Scaffold* komplementäre Überhang des *Revers*-Oligonukleotids bei allen gRNA-Modulen AAAC ist. Die Vektoren pIK5 bis pIK8 und pIK75 bis pIK78 enthalten bereits das als Transkriptionsstart für U6-Promotoren benötigte Guanin als das erste Zielmotiv-spezifische Nukleotid, während diese Position in den Vektoren pIK1 bis pIK4 mit jedem beliebigen Nukleotid bestückt werden kann. Die Hybridisierung der *Forward*- und *Revers*-Oligonukleotide erfolgt indem sie zusammen in einem Reaktionsgefäß auf 95 °C erhitzt werden und dann schrittweise die Temperatur bis auf Raumtemperatur reduziert wird. Die Insertion der hybridisierten Oligonukleotide in die Generischen gRNA-Modulvektoren erfolgt in einer Standard-*Golden-Gate*-Klonierung mit dem Enzym BsaI (pIK1 bis pIK8) bzw. BbsI (pIK75 bis pIK78). Der Einbau des Zielmotiv-spezifischen gRNA-Fragments wird über eine Blau-Weiß-Selektion (pIK1 bis pIK8) und einer Sanger-Sequenzierung der gRNA-Region mit dem Primern IK70 oder IK71 überprüft.

2.2.16.2. Assemblierung der gRNA-Module

Abhängig von der Anzahl der zu assemblierenden gRNA-Module (ein bis vier) wird der Generische gRNA-Assemblierungsvektor (pIK89, pIK60, pIK61, pIK19) gewählt und die gRNA-Module in einer Standard-*Golden-Gate*-Reaktion durch Verdau mit dem Enzym Esp3I assembliert. Der korrekte Zusammenbau der Module kann zum einen über eine Kolonie-PCR und zum anderen über einen Restriktionsverdau der Plasmide mit einem oder mehreren passenden Enzymen überprüft werden.

2.2.16.3. Assemblierung der Promotor-, Endonuklease- und Terminator-Module

Der Endonuklease-Vektor setzt sich aus einem Promotor-Modul, einem Endonuklease-Modul und einem Terminator-Modul zusammen. Die Module werden mit dem Generischen Endonuklease-Assemblierungsvektor pIK20 in einer Standard-*Golden-Gate*-

Reaktion durch Verdau mit dem Enzym SapI assembliert. Der korrekte Zusammenbau der Module kann über eine Kolonie-PCR und über einen Restriktionsverdau der Plasmide mit einem oder mehreren passenden Enzymen überprüft werden. Zudem empfiehlt es sich die Korrektheit des Endonuklease-Vektors mittels Sanger-Sequenzierung zu überprüfen, da bereits kleine Fehler in den Sequenzen zu einem Scheitern von gRNA/Cas9-Experimenten führen können.

2.2.16.4. Finale Assemblierung

Beim finalen Assemblierungs-Schritt werden die gRNA- und Endonuklease-Vektoren in einer Standard-*Golden-Gate*-Reaktion durch Verdau mit dem Enzym BsaI in dem Generischen Transformationsvektor pIK48 zusammengefügt. In diesem Schritt kann auch eine multiple Klonierungsstelle (pIK155) oder ein Fluoreszenz-Marker (pSH290, pAE68) eingefügt werden. Der korrekte Zusammenbau der Module sollte über einen Restriktionsverdau der Plasmide überprüft werden.

2.2.17. Auswahl der Zielmotive

Die Auswahl der Zielmotive erfolgte mithilfe der Online-*Tools* DESKGEN (Doench et al., 2016) und WU-CRISPR (Wong et al., 2015). Der Zielmotiv-spezifische Teil der gRNA hat normalerweise eine Länge von 20 Nukleotiden und sollte mit einem A- oder G-Nukleotid am 5'-Ende starten, da dies die bevorzugten Transkriptionsstartpunkte für U3- bzw. U6-Promotoren sind (Shan et al., 2014). Um eine hohe Funktionalität der gRNAs zu gewährleisten, sollten bei der Auswahl der Zielmotive die Sekundärstrukturen der entsprechenden gRNAs berücksichtigt werden. Liang et al. (2016) haben gezeigt, dass drei häufig vorkommende, sogenannte *Stem loops* im gRNA-*Scaffold* wichtig für die Bindung an die Cas9 sind und somit auch für die Gesamtfunktionalität des gRNA/Cas9-Komplexes von entscheidender Bedeutung sind (Abbildung 11). Ebenso ist es wichtig, dass sich nicht mehr als insgesamt 12 Basenpaare zwischen dem Zielmotiv-spezifischen Teil und dem gRNA-*Scaffold* bilden und nicht mehr als sieben aufeinanderfolgende, zielspezifische Nukleobasen in intramolekulare Basenpaare eingebunden sind. Diese und weitere Aspekte der Auswahl von Zielmotiven wurden in Kumlehn et al. (2018) und Koepfel et al. (2019) zusammengefasst.

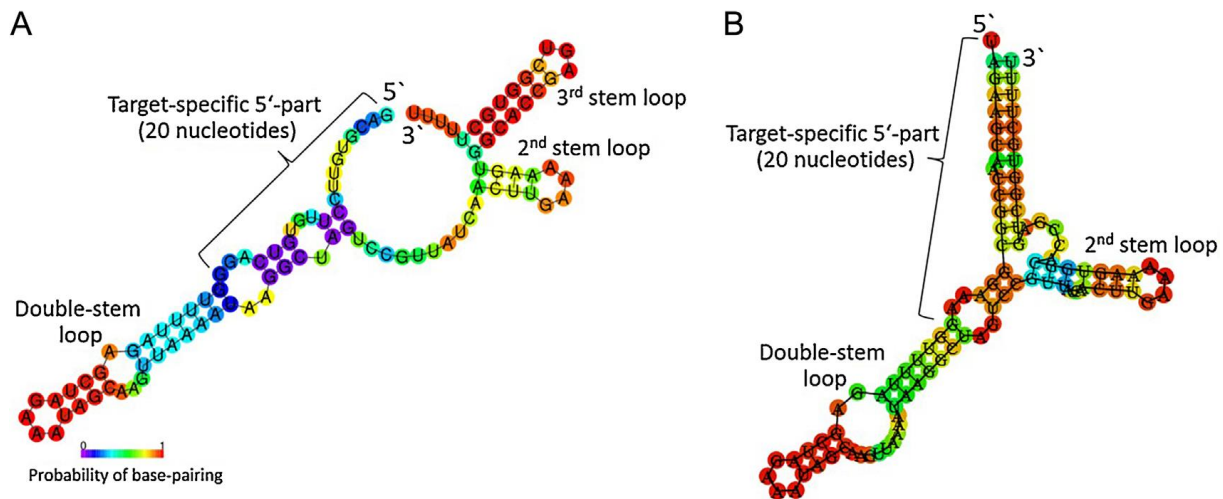


Abbildung 11: Sekundärstrukturen von gRNAs (A) Beispiel für eine gRNA mit voraussichtlich hoher Funktionalität, da der Zielmotiv-spezifische Teil nur eine begrenzte Basenpaarung aufweist und alle drei *Stem loops* vorhanden sind, die für eine korrekte Interaktion mit der Cas9 erforderlich sind. Die Wahrscheinlichkeit, ob Basen wie dargestellt gepaart oder nicht gepaart vorliegen ist durch einen Farbcode gekennzeichnet: von Lila (geringe Wahrscheinlichkeit) bis hin zu Rot (hohe Wahrscheinlichkeit). (B) Zum Vergleich eine gRNA mit stark eingeschränkter Funktionalität, da sie eine hohe Anzahl gepaarter Nucleobasen im Zielmotiv-spezifischen Teil aufweist und der dritte *Stem loop* nicht ausgebildet wird. Die Sekundärstrukturen wurden mit dem RNAfold-Tool generiert. Abbildung aus Kumlehn et al., 2018

Die gRNA-Sekundärstrukturen wurden mit dem RNAfold-Tool modelliert (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>; Gruber et al., 2008). Die Off-Target-Analyse wurde über einen BLAST von Zielsequenzen auf dem GrainGenes BLAST Server (<https://wheat.pw.usda.gov/blast/>; Blake et al., 2019) und dem EnsemblPlants Server (<https://plants.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>) durchgeführt.

2.2.18. Validierung der gRNA-Aktivität durch biolistischen DNA-Transfer in Blattepidermis-Zellen

Um die gRNA-Aktivität zu testen, wurden transiente Expressionstests wie in Budhagatapalli et al. (2016) beschrieben, durchgeführt. Dafür wurden gRNA/Cas9-Expressionsvektoren und Zielvektoren erstellt (s. Kapitel 2.1.10.2. und 2.1.10.3.). Für die Transformation durch Partikelbeschuss (Biolistik) wurden sechs bzw. zehn Blätter von zehn Tage alten Gersten- bzw. Weizenpflanzen verwendet und mit einem DNA-Gold-Gemisch beschossen. Die DNA wurde mit einem Gesamtvolumen von 10 μ l in folgenden Verhältnissen gemischt: 7 μ g des Zielvektors, 7 μ g des gRNA/cas9-Vektors, 2 μ g mCherry-Vektor. Als Positivkontrolle wurde eine Mischung aus einer pNB1-Vektorvariante mit einer intakten YFP-Expressionskassette und dem mCherry-Vektor verwendet, während ein Gemisch aus einem der Zielvektoren und dem mCherry-Vektor als Negativkontrolle diente. Jede Kombination von Konstrukten wurde in zwei unabhängigen Experimenten mit zwei technischen Wiederholungen pro Experiment (d. h. insgesamt vier) getestet.

Nach dem Beschuss wurden die Explantate für 28-48 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Die Expression des Reportergens wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (*Confocal laser scanning microscope*; CLSM780, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) detektiert. Die Visualisierung der mCherry-Fluoreszenz (Emission bei 610 nm) und der YFP-Fluoreszenz (Emission bei 527 nm) erfolgte mittels eines 561 nm Helium-Neon-Lasers und eines 488 nm Argon-Lasers. Die Aktivität der einzelnen gRNA/*cas9*-Konstrukte wurde aus dem Verhältnis zwischen der Anzahl der Zellen, die sowohl ein YFP- als auch ein mCherry-Signal zeigten (YFP-Zellen) und der Gesamtzahl der transgenen Zellen (mCherry-Zellen) berechnet.

2.2.19. Validierung der gRNA-Aktivität durch Protoplastentransformation

Die *HvLox1*-Konstrukte wurden unter anderem durch transiente Expression in Mesophyll-Protoplasten getestet, die aus Blättern einer Woche alter, etiolierter Keimlinge von ‚Golden Promise‘ stammten. Das Protokoll basiert auf der Publikation von Shan et al. (2014). Dreißig Blätter von Gerstenkeimlingen wurden mit einer Rasierklinge in kleine Stücke zerschnitten und die Zellwände mit Macerozyme R-10 und Cellulase R-10 (DUCHEFA BIOCHEMIE B.V, Haarlem, Niederlande) verdaut. Die Protoplasten wurden durch Siebe gereinigt und nach der Polyethylenglykol (PEG) -vermittelten Transformation mit den Konstrukten für 60 h bei 21 °C im Dunkeln inkubiert. Alle Protoplastentransformationen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurde eine Kontrollprobe von Protoplasten mit einem GFP-Konstrukt (pYF133, Fang et al., 2002) transformiert. Nach der Inkubation wurde der GFP-fluoreszierende Anteil der Protoplasten dieser Kontrollprobe mit einem Epifluoreszenzmikroskop (AX200M, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bestimmt. Aus den anderen Proben wurde die DNA nach einem Protokoll von Wang et al. (2016) extrahiert. Etwa 150 bp der Zielregionen wurden mit spezifischen Primern amplifiziert und die Amplifikate tiefensequenziert (Kapitel 2.2.15.2). Die Mutationseffizienzen wurden individuell für jedes Replikat als Anteil der Sequenzier-*Reads* mit Mutation im Verhältnis zur Gesamtzahl der *Reads* berechnet, einschließlich derjenigen mit der Wildtyp-Sequenz.

2.2.20. Pflanzenkultivierung und Transformation

Das Donormaterial wurde wie in Hensel et al. (2009) und Marthe et al. (2015) beschrieben angezogen.

2.2.20.1. Biolistische Weizentransformation

Das verwendete Protokoll wurde modifiziert nach Ismagul et al. (2014).

Unreife Karyopsen wurden auf Eis geerntet und für drei Minuten in Ethanol (70 %) und anschließend für 15 Minuten in Natriumhypochlorit (NaClO, 2,4 %) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf einem Schüttler sterilisiert. Die Körner wurden fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen. Mittels einer Lanzettnadel wurden die unreifen Embryonen isoliert und mit dem Scutellum nach oben auf das Vorkulturmedium gegeben. Die Vorkultivierung erfolgte für fünf Tage im Dunkeln bei 24 °C mit 50 Embryonen pro Platte. Anschließend wurden diese auf Osmotikummedium überführt und für vier bis sechs Stunden im Dunkeln bei 24 °C inkubiert. Die Standard-Beschichtung der Goldpartikel (*Coating*) für die in dieser Arbeit durchgeführten biolistischen Transformationen war: 40 µl Gold (0,6 µm Partikelgröße; Bio-Rad, Best.-Nr. 1652262) aus einer Glycerin-Stock-Lösung mit 60 mg/ml Gold wurden mit 13 µl Glycerin (50 %), 7 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl), 20 µl Spermidin und 50 µl CaCl₂ gemischt und für vier Minuten geschüttelt. Danach wurden die Goldpartikel kurz abzentrifugiert, die Flüssigkeit abgesaugt und 140 µl Ethanol (70 %) dazugegeben. Nach kurzer Zentrifugation und Entfernen der Flüssigkeit wurden 140 µl reines Ethanol dazugegeben und eine Minute bei 2.000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde erneut abgesaugt und die DNA-beschichteten Goldpartikel in 120 µl reinem Ethanol aufgenommen. Pro Schuss wurden 5 µl der Gold-DNA-Mischung eingesetzt. Der Beschuss erfolgte mit einer PDS-1000/He-Partikelkanone (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bei einem Vakuum von 27 inch und einem Beschussdruck von 1.100 psi. Nach dem biolistischen Gentransfer blieben die Embryonen auf Osmotikummedium und wurden über Nacht im Dunkeln bei 24 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen auf Kallus-Induktionsmedium I (25 pro Platte) überführt und für sieben Tage im Dunkeln bei 24 °C kultiviert. Anschließend wurden die Embryonen auf Kallus-Induktions-Medium II überführt und die Platten 14 Tage im Dunkeln bei 24 °C kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine erneute Überführung für weitere 7 Tage auf Kallus-Induktions-Medium III. Die Kallus-Induktionsmedien I bis III unterschieden sich je nach Experiment nur im Gehalt an Hygromycin (Tabelle 7). Die Kallus-bildenden Embryonen wurden anschließend auf Regenerationsmedium I überführt. Die Kultur von je 16 Embryonen pro Platte erfolgte bei 24 °C und 10 Stunden Licht/Tag für 6 Wochen, wobei alle 2 Wochen das Medium gewechselt wurde und in den meisten Experimenten die Hygromyconkonzentration im Regenerationsmedium II (Tabelle 7) reduziert wurde. Sprossbildende Kallusformationen wurden anschließend auf Regenerationsmedium III

überführt und für zwei Wochen bei Licht und 24 °C kultiviert. Pflänzchen, die Wurzeln gebildet hatten wurden in Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) überführt und in einer Klimakammer kultiviert.

Tabelle 7: Hygromycingehalte in den Medien nach der biolistischen Weizentransformation

Experiment	Hygromycinkonzentration in Medien				
	Kallus-Induktion	Kallus-	Kallus-Induktion	Regeneration I	Regeneration
	I	Induktion II	III		II+III
WI1/ WI3	-	20 mg/L	50 mg/L	25 mg/L	20 mg/L
WI7.1/WI8.1/ WI9.1/WI10.1	-	30 mg/L	50 mg/L	25 mg/L	20 mg/L
WI7.2/WI8.2/ WI9.2/WI10.2	50 mg/L	30 mg/L	30 mg/L	25 mg/L	20 mg/L
WI11/WI12	50 mg/L	-	-	-	-

2.2.20.2. Agrobakterien-vermittelte Weizentransformation

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von unreifen Weizenembryonen wurde nach einer zuvor beschriebenen Methode (Hensel et al., 2009; Marthe et al., 2015) durchgeführt. Die primär-transgenen Pflanzen wurden mit unterschiedlichen Hygromycinkonzentrationen nach der Transformation selektiert. Die Experimente unterschieden sich dabei bezüglich der Selektionsregimes (Tabelle 8). Mittels PCR wurden die Pflanzen auf das Vorhandensein des *hpt*-Gens getestet.

Tabelle 8: Hygromycingehalte in den Medien nach der Agrobakterien-vermittelten Weizentransformation

Experiment	Hygromycinkonzentration in Medien				
	Kallus-Induktion	Kallus-	Kallus-Induktion	Regeneration	Regeneration
	I	Induktion II	III	I	II+III
WI13	-	20 mg/L	30 mg/L	25 mg/L	20 mg/L
WI14/WI17/ WI19	50 mg/L	-	-	-	-
WI15	-	20 mg/L	30 mg/L	25 mg/L	25 mg/L
WI16	-	20 mg/L	50 mg/L	25 mg/L	-
WI18	-	20 mg/L	50 mg/L	12,5 mg/L	12,5 mg/L/ -

2.2.20.3. Agrobakterien-vermittelte Gerstentransformation

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von unreifen Gerstenembryonen wurde nach einer zuvor beschriebenen Methode (Hensel et al., 2009; Marthe et al., 2015) durchgeführt. Die primär-transgenen Pflanzen wurden mit 50 mg/L Hygromycin selektiert. Mittels PCR wurden die Pflanzen auf das Vorhandensein des *hpt*-Gens getestet.

2.2.21. Nachweis von Transfer-DNA mittels PCR

Das *hpt*-Gen wurde in einer Standard-PCR-Reaktion mit den Primern IK273 und IK274 in transgenen Pflanzen nachgewiesen. Es wurde ein 1100 bp großes Fragment amplifiziert. Beispielhaft für diesen Nachweis wird in Abbildung 12 das Ergebnis der *hpt*-PCR für die Transformationsexperimente BG891 und BG897 dargestellt.

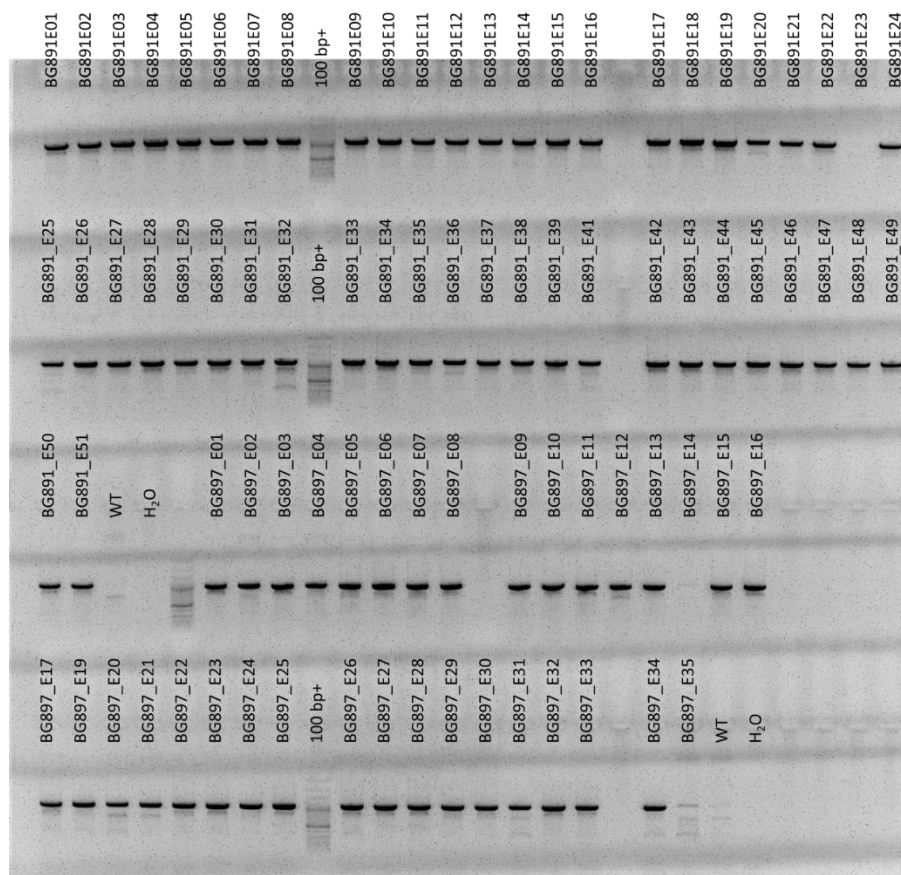


Abbildung 12: Transgen-Nachweis mittels PCR WT: Wildtyp Kontrolle; H₂O: Wasser als negativ Kontrolle; 100 bp+: 100 bp Plus DNA-Leiter von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

2.2.22. Resistenztests

Drei bis vier Nachkommen der gewählten *HvStp13*-Mutanten und die Kontrollen ‚Golden Promise‘ und ‚Großklapprige‘ wurden mit dem *Puccinia hordei*-Isolat I-80 im Gewächshaus nach einer zuvor beschriebenen Methode (Ivandić et al., 1998; König et al., 2012) inokuliert. Für die Erfassung der Resistenz im juvenilen und adulten Stadium

wurden zehn bzw. 28 Tage alte Pflanzen inokuliert. Die inokulierten Pflanzen wurden in einer Wachstumskammer (20-22 °C, 16 h Licht/Tag) unter einer Plastikabdeckung für 24 Stunden kultiviert, um eine feuchte Umgebung für eine erfolgreiche Infektion zu schaffen. Die Infektionstypen wurden 12 Tage nach der Inokulation anhand der 0-4-Skala von Levine und Cherewick (1952) und Parlevliet (1976) erfasst (Tabelle 9).

Tabelle 9: Boniturschlüssel

Infektionstyp	Beschreibung	Zuordnung
0 _n	Hochresistent; keine Pusteln, deutlich ausgebildete Nekrosen	Resistent
0 _c	Hochresistent; keine Pusteln, deutlich ausgebildete Chlorosen	Resistent
0-2	Resistent; je nach Umwelt auch einige Pusteln Typ 2 ⁻ möglich	Resistent
1	Resistent; sehr kleine Pusteln, die in deutlich ausgebildeten nekrotischen Flächen eingebettet sind	Resistent
2 ⁻	Mäßig resistent; kleine, wenig sporulierende Pusteln, in nekrotischem und z.T. chlorotischem Blattgewebe eingebettet	Resistent
2 ⁺	Pusteln unterschiedlicher Größe, umgeben von nekrotischem aber vorwiegend chlorotischem Blattgewebe	Anfällig
2-3	Mäßig anfällig	Anfällig
3	Anfällig; mittelgroße, gut sporulierende Pusteln, das Blattgewebe ist chlorotisch, keine Nekrosen	Anfällig
4	Hochanfällig; große, gut sporulierende Pusteln, keine Nekrosen, kaum Chlorosen	Anfällig

2.2.23. *Calcofluor White*-Färbung und Mikroskopie

Die *Calcofluor White*-Färbung erfolgte nach einer zuvor beschriebenen Methode (Serfling et al., 2016). Von jeweils zwei (im juvenilen Stadium getestet) bzw. vier (im adulten Stadium getestet) Nachkommen einer Mutante wurden Blattproben fünf und 12 Tage nach der Infektion genommen und in Reaktionsgefäße (2 ml) mit 1,5 ml vorgelegter Entfärbelösung überführt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfärbelösung wurde verworfen und 1,5 ml Lactophenol/Ethanol (1:2 v/v) -Mischung zugefügt. Die Proben wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für zehn Minuten aufgekocht. Die Lösung wurde verworfen und die Blattproben für 15 Minuten lang bei Raumtemperatur in 1,5 ml 70 %igem Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer 0,05 M Natriumhydroxid-Lösung 15 Minuten lang geschüttelt, gefolgt von einer Inkubation für 15 Minuten in sterilem Wasser. Darauf folgte eine Inkubation in einer 0,1 M Tris-HCl-Lösung. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde diese Lösung verworfen und die *Calcofluor White*-Lösung zugegeben, die wiederum nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur verworfen wurde. Die Proben wurden viermal mit sterilem Wasser gewaschen und auf

einem Objektträger in einer Glycerin/Wasser-Lösung (1:1 v/v) eingebettet. Die Mikroskopie der Blattzellen und Pilzstrukturen wurde mit einem Axiovert 200 M in Verbindung mit einer AxioCam 506 color und der ZEN 3.0 Blue Software (Carl Zeiss AG, Jena) durchgeführt. Die *Calcofluor White* angefärbten Pilzstrukturen wurden mit dem Filter Set 01 (BP 365/12, FT 395, LP 397) bei 20x- und 40x-Vergrößerung beobachtet. Pro Blattprobe wurden jeweils 10 Infektionsstellen ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. CasCADE - ein modulares und variables Vektorsystem

Die Genomeditierung ist ein sich rasant entwickelndes Feld, was sich unter anderem in der hohen Anzahl der Publikation pro Monat widerspiegelt. Für die simultane Expression von mehreren gRNAs (Multiplex-Anwendungen) und um neue Entwicklungen vor allem in Getreidepflanzen schnell implementieren zu können, wurde das modulare Vektorsystem CasCADE für die Anwendung von RNA-geleiteten Cas-Endonukleasen entwickelt. CasCADE basiert, wie viele andere zeitgemäße Vektorsysteme auch, auf der *Golden-Gate*-Klonierung. Das CasCADE-System wurde anhand von konkreten Anwendungsbeispielen der Zielsequenz-spezifischen Mutagenese sowohl bei Triticeen und Mais als auch bei Dikotyledonen erfolgreich erprobt. Insgesamt wurden in dieser Arbeit etwa 50 *Golden Gate*-kompatible Modulvektoren erstellt. Dazu gehören Module für die Expression von gRNAs, verschiedene Endonuklease-Derivate und weitere optional einsetzbare Elemente wie z.B. simultan exprimierte Reportergene.

3.1.1. Schritt 1: Der Zusammenbau einer individuellen gRNA-Expressionseinheit

Für die Expression der gRNAs wurden drei verschiedene Pol III-kompatible Promotoren ausgewählt, die bereits ihre Effizienz in den für unsere Arbeiten am häufigsten verwendeten Pflanzenarten (Weizen, Gerste, Mais, Tabak und *Arabidopsis*) gezeigt hatten. Für die Monokotyledonen wurden ein Reis U3-Promotor (OsU3) sowie ein Weizen U6-Promotor (TaU6) und für die Dikotyledonen der *Arabidopsis* U6-26-Promotor (AtU6-26) verwendet. Eine *lacZ*-Expressionskassette wurde in den Generischen gRNA Modulvektoren (pIK1-pIK8, für die Anwendung in Monokotyledonen) zwischen den Promotor und das gRNA-*Scaffold* gesetzt, um eine Blau-Weiß-Selektion zu ermöglichen. Alle Module werden von zwei Typ-IIS-Restriktionsschnittstellen flankiert. Die jeweiligen Überhänge sind so gewählt, dass die Module für ein bis vier gRNAs in der vorgesehenen Reihenfolge in einer Reaktion assembliert werden. Die Generischen gRNA-Modulvektoren und die Generischen gRNA-Assemblierungsvektoren mit den jeweiligen Überhängen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Für die Assemblierung der gRNA-Vektoren wird das Enzym Esp3I verwendet. Je nachdem ob eine, zwei, drei oder vier gRNAs integriert werden sollen, kamen die Generischen gRNA-Assemblierungsvektoren pIK89, pIK60, pIK61 bzw. pIK19 zum Einsatz.

Tabelle 10: gRNA-Module

Generischer gRNA-Modulvektor	Position	Esp3I 5'-Überhang	Fragment	Esp3I 3'-Überhang
pIK1	1	A ttgc	OsU3-p::gRNA-Scaffold-tttttt	B cgaa
pIK2	2	B gctt		C ggga
pIK3	3	C ccct		D gccca
pIK4	4	D cggt		E ctga
pIK5	1	A ttgc	TaU6-p::gRNA-Scaffold-tttttt	B cgaa
pIK6	2	B gctt		C ggga
pIK7	3	C ccct		D gccca
pIK8	4	D cggt		E ctga
pIK75	1	A ttgc	AtU6-26-p::gRNA-Scaffold-tttttt	B cgaa
pIK76	2	B gctt		C ggga
pIK77	3	C ccct		D gccca
pIK78	4	D cggt		E ctga
Generischer gRNA-Assemblierungsvektor				
pIK89 (1 gRNA)		B gctt	Backbone mit specR	A aacg
pIK60 (2 gRNAs)		C ccct		A aacg
pIK61 (3 gRNAs)		D cggt		A aacg
pIK19 (4 gRNAs)		E gact		A aacg

Der erste Schritt zur Erstellung eines individuellen gRNA-Modulvektors ist die Auswahl der Zielsequenz in dem jeweiligen Kandidatengen. Abhängig von dem zu verwendenden Promotor sollte das erste Nukleotid der gRNA ein Guanin (G) oder Adenin (A) sein (s. Kapitel 2.2.17.). Das Zielmotiv-spezifische 5'-Ende der gRNA-Sequenz wird zunächst aus zwei entsprechend komplementären Oligonukleotiden hybridisiert, sodass sich ein DNA-Molekül mit zu dem Promotor und dem gRNA-*Scaffold* passenden Überhängen bildet (Abbildung 13A). Mit dem Enzym BsaI (pIK1-pIK8) bzw. BbsI (pIK75 – pIK78) lässt sich das individuelle Zielmotiv-spezifische 5'-Ende der gRNA-Sequenz in die Generischen gRNA-Modulvektoren einsetzen. Im nächsten Schritt können bis zu vier gRNA-Module in einem *Golden-Gate*-Klonierungsschritt mit dem Enzym Esp3I assembliert werden (Abbildung 13B). Alle Generischen gRNA-Assemblierungsvektoren enthalten zusätzlich zu den jeweiligen Antibiotika-Resistenzgenen eine *ccdB*-Kassette als negativen Selektionsmarker. *ccdB* codiert für den für viele *E. coli*-Laborstämme toxischen DNA-Gyrase-Hemmer und bei einem korrekten Einbau der Fragmente wird die *ccdB*-Kassette entfernt.

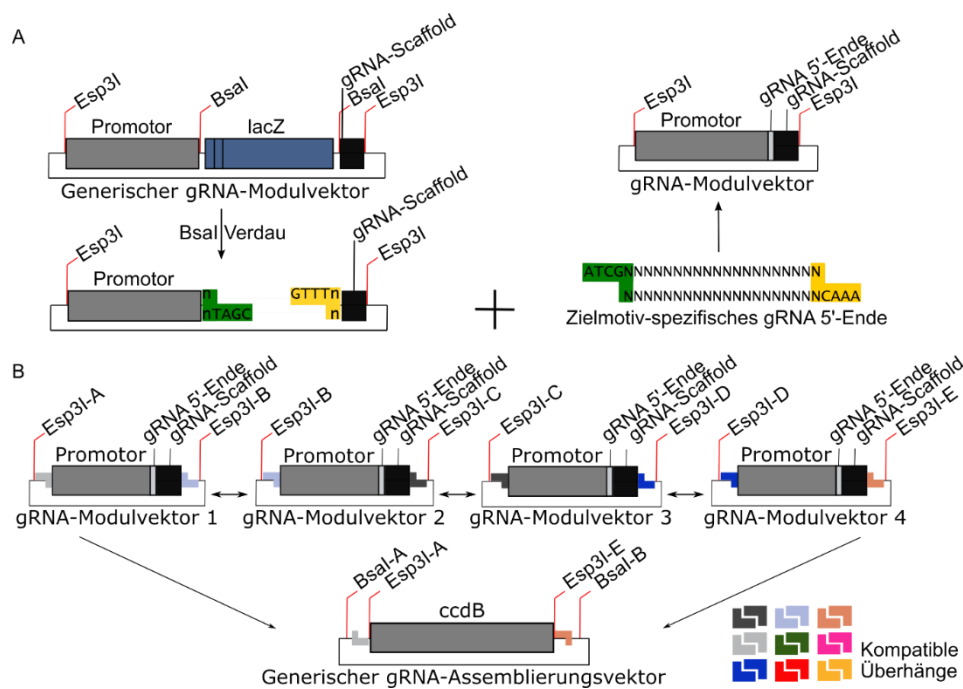


Abbildung 13: gRNA-Assemblierung (A) In die einzelnen Generischen gRNA-Modulvektoren wird das Zielmotiv-spezifische 5'-Ende der gRNA-Sequenz nach BsaI-Verdau mittels spezifischer Basenüberhänge kloniert. (B) Die einzelnen gRNA-Modulvektoren werden in einer Golden-Gate-Klonierung mit dem Enzym Esp3I assembliert. Die kompatiblen Überhänge sind durch Buchstaben (A-E) und jeweils übereinstimmende Farben gekennzeichnet.

3.1.2. Schritt 2: Der Zusammenbau einer Endonuklease-Expressionseinheit

Analog zu der gRNA-Assemblierung lassen sich auch alle Elemente der Endonuklease-Expressionseinheit individuell miteinander kombinieren, um eine maximale Variabilität zu gewährleisten. Alle Promotor-, Endonuklease-, und Terminator-Modulvektoren sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Die aus *Streptococcus pyogenes* stammende *cas9* wurde für Arabidopsis und für Mais Codon-optimiert (*cAt-cas9* und *cZm-cas9*) und diese bilden die Kernstücke der Endonuklease-Expressionseinheiten. Basierend auf der *cZm-cas9* wurden die codierenden Sequenzen einer D10A-Nickase (*cZm-cas9-D10A*) und die artifizialen Derivate für xCas9 (*cZm-xcas9*) und Cas9-NG (*cZm-cas9-NG*) kloniert. Zuletzt kamen zum Vektorset noch die Basen-Editoren CDA und ADA hinzu, um präzisere Genveränderungen zu ermöglichen.

Drei verschiedene Promotoren wurden für die Expression der Endonukleasen zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden drei Terminator-Modulvektoren generiert, wobei standardmäßig der in dieser Arbeit erstellte Doppelterminator, bestehend aus 35S-Terminator und *nos*-Terminator, verwendet wurde. Ebenso wie bei den gRNA-Modulen wurden bei allen Endonuklease-Modulen mittels spezieller Primer an jedes Fragment

spezifische Überhänge angefügt, um einen gerichteten Zusammenbau der einzelnen Fragmente in der *Golden-Gate*-Reaktion zu ermöglichen.

Tabelle 11: Promotor-, Endonuklease-, und Terminator-Modulvektoren für die Endonuklease-Expressionseinheit

Modulvektoren	Position	SapI 5'-Überhang	Fragment	SapI 3'-Überhang
pIK12	1	A ttg	2x35S-p	B acc
pIK74	1	A ttg	ZmUbi1-p	B acc
pIK79	1	A ttg	PcUbi4-2-p	B acc
pIK14	2	B tgg	cZm-cas9	C cca
pIK21	2	B tgg	cZm-cas9-D10A	C cca
pIK73	2	B tgg	cZm-xcas9 (Monkotyle)	C cca
pIK80	2	B tgg	cZm-xcas9 (Dikotyle)	C cca
pIK81	2	B tgg	cAt-cas9	C cca
pIK87	2	B tgg	cZm-xcas9-D10A	C cca
pSH248	2	B tgg	cZm-cas9-NG	C cca
pSH250	2	B tgg	cZm-cas9-D10A-ADA	C cca
pSH307	2	B tgg	cZm-cas9-D10A-CDA	C cca
pIK15	3	C ggt	GFP	E cat
pIK58	3	C ggt	nos-t	D cga
pIK82	3	C ggt	35S-t+nos-t	D cga
pIK16	4	E gta	nos-t	D cga
Generischer Endonuklease-Assemblierungsvektor				
pIK20		D gct	Backbone mit specR	A aac

Der Zusammenbau der Promotor-, Endonuklease-, und Terminator-Module (Abbildung 14) erfolgt mit dem Typ-IIIS- Restriktionsenzym SapI, das einen drei Nukleotide-langen Überhang erzeugt. Für die praxisrelevante Anwendung wurden vorassemblierte Endonuklease-Vektoren zur Verfügung gestellt, bestehend aus einem Promotor, einem *cas9*-Derivat und einem Terminator.

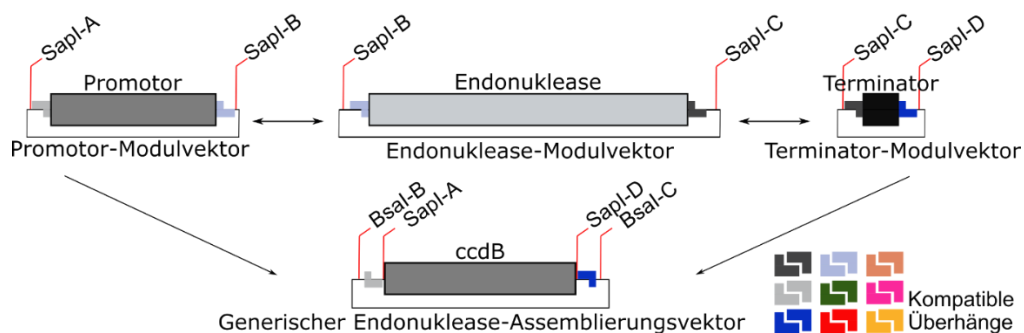


Abbildung 14: Endonuklease-Assemblierung Die einzelnen Promotor-, Endonuklease-, und Terminator-Modulvektoren werden in einer Golden-Gate-Klonierung mit dem Enzym SapI assembliert. Die kompatiblen Überhänge sind durch Buchstaben (A-D) und jeweils übereinstimmende Farben gekennzeichnet.

3.1.3. Schritt 3: Die finale Assemblierung zu einer funktionellen Expressionseinheit

Im dritten *Golden-Gate*-Schritt werden die individuellen gRNA- und Endonuklease-Vektoren miteinander kombiniert (Abbildung 15A). Diese Klonierung erfolgt mit dem Enzym BsaI. Ebenso wie bei den weiter oben beschriebenen Modulen wurden die Assemblierungsmodule der Generischen Assemblierungsvektoren und des Generischen Transformationsvektor mit der entsprechenden Erkennungssequenz für BsaI und verschiedenen vier Nukleotide-langen Überhängen ausgestattet, die eine effiziente und korrekte Assemblierung ermöglichen. Für einfache Anwendungen (z.B. bei nur einer gRNA pro Vektor) wurden Generische Einzelvektoren erstellt, in die nur noch die individuelle gRNA mittels BsaI eingefügt werden muss (Abbildung 15B).

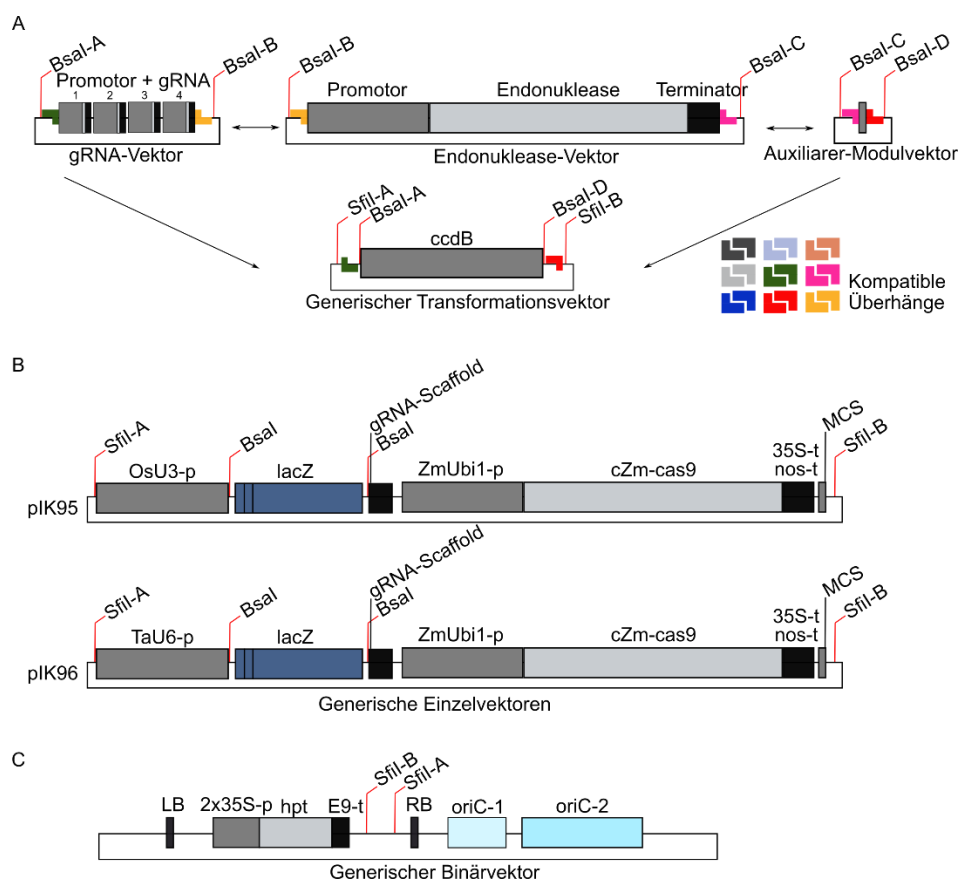


Abbildung 15: Finale Assemblierung (A) Die gRNA- und Endonuklease-Vektoren werden in einer *Golden-Gate*-Klonierung mit dem Enzym BsaI zu dem finalen Vektor assembliert. In diesem Schritt wird an der dritten Position ein auxiliäres Modul eingefügt, das eine multiple Klonierungssequenz (MCS) enthält und das vorherige Einfügen von zusätzlichen funktionellen Elementen (z.B. Expressionseinheiten für Reportergene) ermöglicht. Die kompatiblen Überhänge sind durch Buchstaben (A-D) und jeweils übereinstimmende Farben gekennzeichnet. (B) In die *Ready-to-use*-Vektoren pIK95 und pIK96 kann mittels einer *Golden-Gate*-Klonierung mit dem Enzym BsaI direkt eine Zielmotiv-spezifische 5'-gRNA-Sequenz eingefügt werden. (C) Der Standardbinärvektor enthält als Selektionsmarker das *hpt*-Gen und chromosomale Replikationsursprünge (*origin of chromosomal replication, oriC*) für *E. coli* (*oriC-1*) und Agrobakterien (*oriC-2*).

Der finale Transformationsvektor kann für den direkten DNA-Transfer (z.B. PEG-vermittelt oder biolistisch) verwendet werden. Mittels SfiI lassen sich die assemblierten Expressionseinheiten gerichtet in einen Generischen Binärvektor klonieren, der für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von Pflanzen verwendet werden kann (Abbildung 15C). Alle bisher zur Verfügung gestellten Generischen Assemblierungsvektoren, Endonuklease-Vektoren, Auxiliare Modulvektoren und anwendungsbereite Generische Einzelvektoren sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Module zur Assemblierung eines Transformationsvektors

Generischer gRNA-Assemblierungsvektor	Position	Bsal 5'-Überhang	Fragment	Bsal 3'-Überhang
1 pIK89	1	A aggt	1 gRNA	B ggctc
1 pIK60	1	A aggt	2 gRNAs	B ggctc
1 pIK61	1	A aggt	3 gRNAs	B ggctc
1 pIK19	1	A aggt	4 gRNAs	B ggctc
Endonuklease-Vektoren				
pIK20	2	B ccag	Endonuklease Expressionseinheit	C gctt
pIK83	2	B ccag	ZmUbi1-p::cZm-cas9-35S-t+nos-t	C gctt
pIK84	2	B ccag	ZmUbi1-p::cZm-xcas9-35S-t+nos-t	C gctt
pIK94	2	B ccag	ZmUbi1-p::cZm-cas9-nos-t	C gctt
pIK137	2	B ccag	ZmUbi1-p::cZm-cas9-NG-35S-t+nos-t	C gctt
pSH273	2	B ccag	ZmUbi1-p::cZm-cas9-D10A-ADA-35S-t+nos-t	C gctt
pME40	2	B ccag	ZmUbi1-p::cZm-cas9-D10A-CDA-35S-t+nos-t	C gctt
pRB20	2	B ccag	PcUbi4-2-p::cAt-cas9-35S-t+nos-t	C gctt
Auxiliare Modulvektoren				
pIK155	3	C cgaa	MCS	D aggc
pSH290	3	C cgaa	ZmUbi1-p::GFP-35S-t+nos-t	D aggc
pAE68	3	C cgaa	2x35S-p::mCherry-nos-t+nos-t	D aggc
Generischer Transformationsvektor				
pIK48		D tccg	Backbone mit ampR	A tcca
Generische Einzelvektoren				
pIK95			OsU3-p::gRNA-Scaffold-tttttt ZmUbi1-p::cZm-cas9-35S-t+nos-t	
pIK96			TaU6-p::gRNA-Scaffold-tttttt ZmUbi1-p::cZm-cas9-35S-t+nos-t	

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit dem CasCADE-Vektorsystem in insgesamt drei *Golden-Gate*-Klonierungsschritten individuelle Expressionsvektoren für Multiplex-Anwendungen hergestellt werden können. Jedes Modul ist austauschbar was eine flexible Anpassung des Vektorsystems an zukünftige Entwicklungen ermöglicht.

3.1.4. Validierung des modularen Vektorsystems

Die Funktionalität des Vektorsystems wurde in transienten Expressionstests überprüft. Dafür wurden zwei gRNAs ausgewählt, die ihre Ziel motive (ZM) im *Lipoxygenase-1* Gen der Gerste (*HvLox1*) haben (Abbildung 16A) und zu vier finalen Transformationsvektoren (einmal gRNA1, zweimal gRNA1, viermal gRNA1 und zweimal gRNA1 plus zweimal gRNA2) assembliert (Abbildung 16B).

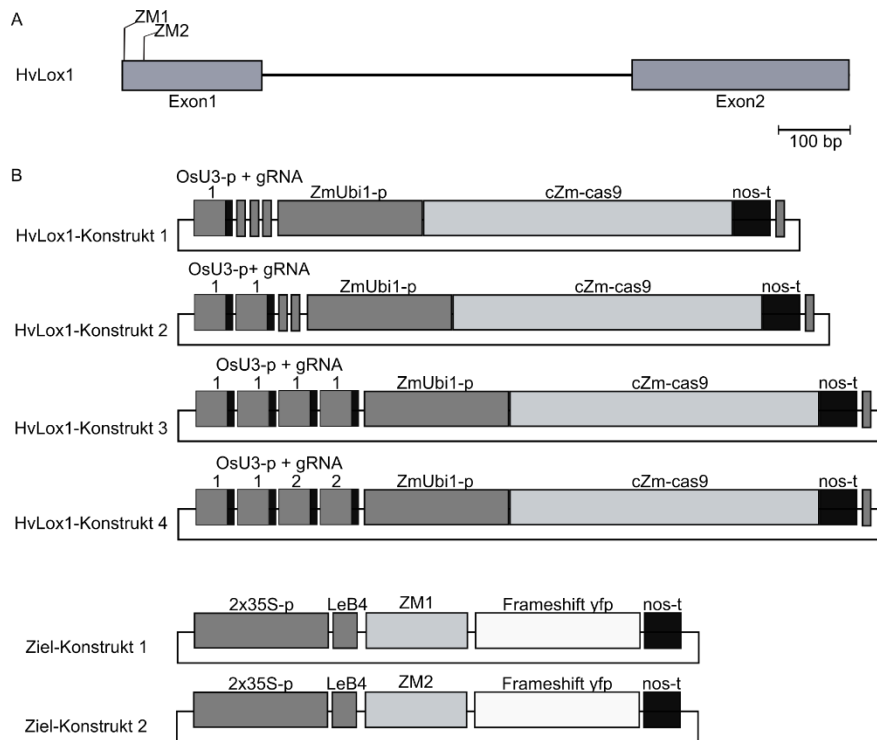


Abbildung 16: *HvLox1*-Konstrukte (A) Grafische Darstellung des Lipoxygenase-1 Gens und der beiden Ziel motive (ZM) im ersten Exon. (B) Die vier *HvLox1*-Konstrukte mit einer bis vier gRNAs und die beiden Ziel Konstrukte mit jeweils dem ersten oder zweiten Zielmotiv und einem nicht funktionalen YFP. LeB4: *Vicia faba* Legumin B4-Signalpeptid

Für den ersten Versuch wurde ein biolistisches Testsystem verwendet (s. Abschnitt 2.2.18.). Zwei Zielvektoren wurden erstellt, indem jeweils das Zielmotiv von gRNA1 oder gRNA2 in *HvLox1* inklusive des dazugehörigen PAMs vor ein stillgelegtes *yfp* kloniert wurden (Abbildung 16B). Der Zielvektor wurde zusammen mit dem gRNA/cas9-Expressionsvektor und einem *mCherry*-Expressionsvektor auf Gerstenblätter geschossen. Für die *HvLox1*-Konstrukte 1 bis 3 wurde der Zielvektor 1 verwendet und für das Konstrukt 4 wurde nur der Zielvektor 2 verwendet. In den Zellen der Blätter wird der gRNA/Cas9-Komplex aktiv und schneidet das im Zielvektor vorliegende Zielmotiv. Als Resultat wird der Leserahmen des *yfps* wiederhergestellt, sodass im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gelb fluoreszierende Zellen detektiert werden können (Abbildung

17). Da als Kontrolle ein *mCherry*-Expressionsvektor co-transformiert wurde, konnte die Mutationseffizienz normalisiert werden, indem der Anteil der zusätzlich gelb fluoreszierenden von den rot fluoreszierenden Zellen ermittelt wurde (Budhagatapalli et al., 2016).

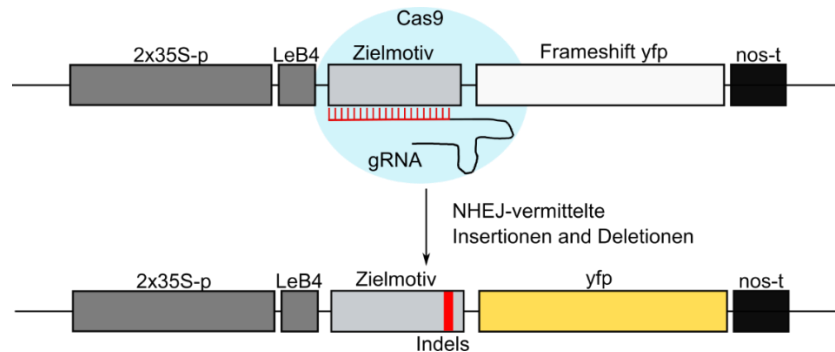


Abbildung 17: Das Prinzip des biologischen Testsystems Die Integration des Zielmotivs inklusive des dazugehörigen PAMs führt zu einer Leserahmenverschiebung im *yfp*. Die Co-Transformation des Zielvektors mit dem gRNA/cas9-Vektor führt dazu, dass das Zielmotiv im Zielvektor geschnitten wird und durch den fehlerhaften Reparaturmechanismus der Nicht-homologen Endverknüpfung entstehen im Zielmotiv Insertionen oder Deletionen (Indels). Durch diese Mutationen wird der *yfp*-Leserahmen in einigen der in jeder Zelle vorhandenen Plasmide wiederhergestellt und führt zu einem YFP-Signal. (Abbildung modifiziert nach Budhagatapalli et al., 2016)

Es wurden für alle vier Konstrukte sowohl rot als auch gelb fluoreszierende Zellen detektiert. Somit waren die gRNAs und Cas9 aktiv und Mutationen wurden auf dem Zielvektor induziert. Obwohl die Konstrukte zu unterschiedlichen Effizienzwerten führten, war die Ermittlung signifikanter Unterschiede nicht möglich, da die Wiederholung des Experiments fehlgeschlagen war und somit nur zwei technische Replikate auswertbar waren. Tendenziell wiesen die Konstrukte 2 und 4, in denen zweimal die gRNA1 (Konstrukt 2) und zweimal die gRNA1 und zweimal die gRNA2 (Konstrukt 4) verwendet wurden, eine höhere Mutationseffizienz (über 80 %) auf (Abbildung 18). Um die Ergebnisse aus dem biologischen Test zu bestätigen, wurden die vier *HvLox1*-Konstrukte auch in einem Protoplasten-Assay getestet. Dafür wurden Protoplasten mit den vier Konstrukten transformiert und anschließend genomische DNA isoliert. Die Zielmotive der gRNAs wurden amplifiziert und die Amplikons tiefensequenziert.

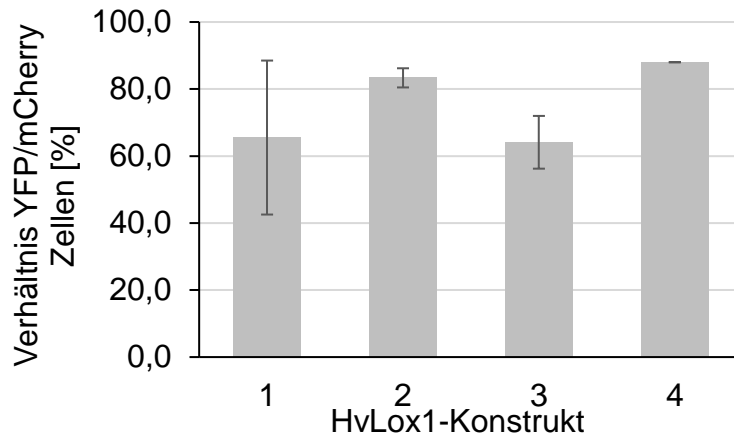


Abbildung 18: Effizienztest der HvLox1-Konstrukte Das Verhältnis von YFP- zu mCherry-fluoreszierenden Zellen spiegelt den Anteil der Zellen mit Mutationsereignissen wieder. Aus diesem Verhältnis lässt sich die Mutationseffizienz der einzelnen Konstrukte ableiten. n=2, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

In Abbildung 19A ist das Verhältnis von wildtyp und mutierten *Reads* dargestellt. Aus diesem Verhältnis wurde die Mutationseffizienz abgeleitet, die bei allen Konstrukten zwischen 60 und 65 % lag. In Abbildung 19B ist die Häufigkeit mutierter Ziel motive dargestellt. Bei allen Konstrukten war eine 3 bp-Deletion im ersten Zielmotiv die häufigste Mutation (> 50 % der mutierten *Reads*). Über 10 % der mutierten *Reads* hatten eine 8 bp-Deletion im ersten Zielmotiv. Die Mutationsmuster der *HvLox1*-Konstrukte 1-3 sind in Abbildung 19C dargestellt. Im Zielmotiv 1 gibt es um die Schnittstelle der Cas9 eine 3 bp-Mikrohomologie (GCT), wobei eine der beiden Wiederholungen dieser drei Nukleotide präzise deletiert wurden (s. Mikrohomologie-basierte Endverknüpfung in Kapitel 1.2.). Auch für das Konstrukt 4 war die häufigste Mutation die 3 bp-Deletion im Zielmotiv 1. Das Zielmotiv 2 wurde in keinem Fall einzeln mutiert und nur 0,6 % der mutierten *Reads* wiesen die 26 bp-Deletion zwischen den beiden Zielmotiven auf, die zudem das einzige Mutationsmuster war, das auf eine Prozessierung von Zielmotiv 2 zurückgeht (Abbildung 19D).

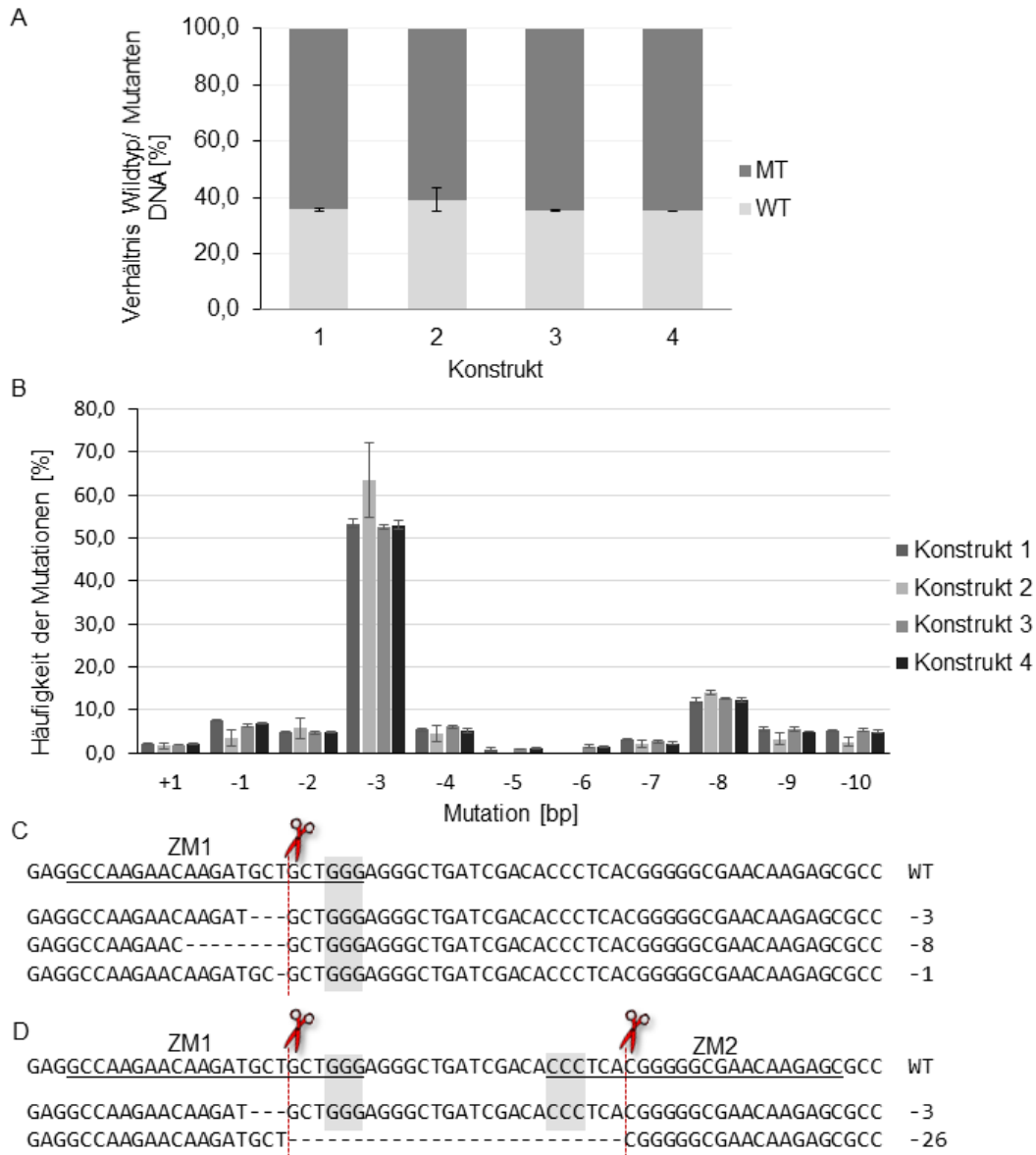


Abbildung 19: Mutationseffizienz der HvLox1-Konstrukte in Protoplasten (A) Das Verhältnis von mutierter zu Wildtyp-DNA zeigt die Mutationseffizienz der vier HvLox1-Konstrukte. (B) Die Häufigkeit der detektierten Mutationen von einer 1 bp-Insertion bis zu 10 bp-Deletionen. (C) Darstellung der häufigsten Sequenzen in Protoplasten mit Konstrukt 1. (D) Darstellung der häufigsten Sequenzen in Protoplasten mit Konstrukt 4. Zusätzlich wird die Deletion zwischen den Zielmotiven 1 und 2 gezeigt. Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt. n=3, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sowohl der Zusammenbau der einzelnen Module des Vektorsystems verlässlich funktionierte als auch, dass die Induktion von Mutationen in den beiden Testexperimenten effizient erfolgte.

3.2. Gezielte Mutagenese von *Lr67* des Weizens

In alten und ostasiatischen Landrassen wurde das Resistenzgen *Lr67* identifiziert. Dahinter verbirgt sich der zuerst in *Arabidopsis* beschriebene Zuckertransporter STP13 (Nørholm et al., 2006). In Weizen ist das Gen auf dem Chromosom 4D lokalisiert und kommt in zwei Varianten vor. Das Wildtyp-Allel unterscheidet sich von dem Resistenzvermittelnden Allel in zwei Nukleotiden, die zu veränderten Aminosäuren an den Positionen 144 und 387 führen. In Hefeassays wurde gezeigt, dass *Lr67sus* ein funktionaler Zuckertransporter ist, während *Lr67res* keinen Zucker transportieren kann. Wurde in *Lr67res* die Aminosäure an Position 144 von Arginin zu Glycin (R144G,) geändert, was an dieser Position dem Wildtyp entspricht, konnte die Zuckertransportfunktion wiederhergestellt werden, während der Austausch der Aminosäure an Position 387 Leucin zu Valin (L387V) nicht zu der Wiederherstellung der Zuckertransportfunktion führte (Moore et al., 2015). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der SNP an Position 431 der CDS als relevanter eingestuft, da alleine dieser SNP den Zuckertransport unterdrücken kann, während der Aminosäureaustausch L387V lediglich zu einer Verringerung des Zuckertransports führt aber keine Resistenz vermittelt. Der SNP an Position 431 resultiert in dem Aminosäureaustausch G144R und liegt im zweiten Exon von *Lr67* (Abbildung 20). Die Homeoallele der A- und B-Subgenome wiesen beide SNPs nicht auf. Die drei Homeoallele von *Lr67* (*Lr-A67*, *Lr-B67*, *Lr-D67*) wurden basierend auf der Weizen-Sorte ‚Thatcher‘ bereits detailliert beschrieben und die Codierungssequenzen bei NCBI hinterlegt (Moore et al., 2015).

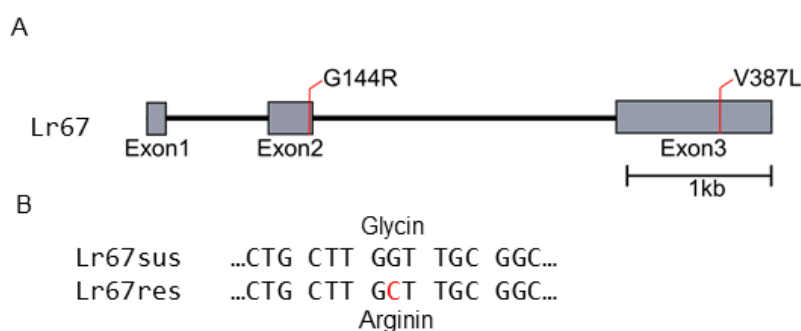


Abbildung 20: *Lr67* in Weizen (A) Schematische Darstellung des *Lr67*-Gens mit den Aminosäureaustauschen G144R und V387L. (B) Das Wildtyp-Allel (*Lr67sus*) codiert an der Position 144 für ein Glycin, während das Resistenz-vermittelnde Allel (*Lr67res*) an dieser Stelle ein Arginin hat. Dieser Aminosäureaustausch wird durch einen SNP hervorgerufen.

Zunächst wurde die publizierte und bei NCBI hinterlegte *Lr67*-Sequenz mittels EnsemblPlants (https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Tools/Blast, Februar 2018) mit dem dort verfügbaren Weizenreferenzgenom (‚Chinese Spring‘) verglichen.

Dabei wurde eine 100-prozentige Übereinstimmung mit einem Zuckertransporter auf dem Chromosom 4D des Weizens festgestellt (*TraesCS4D02G243100*).

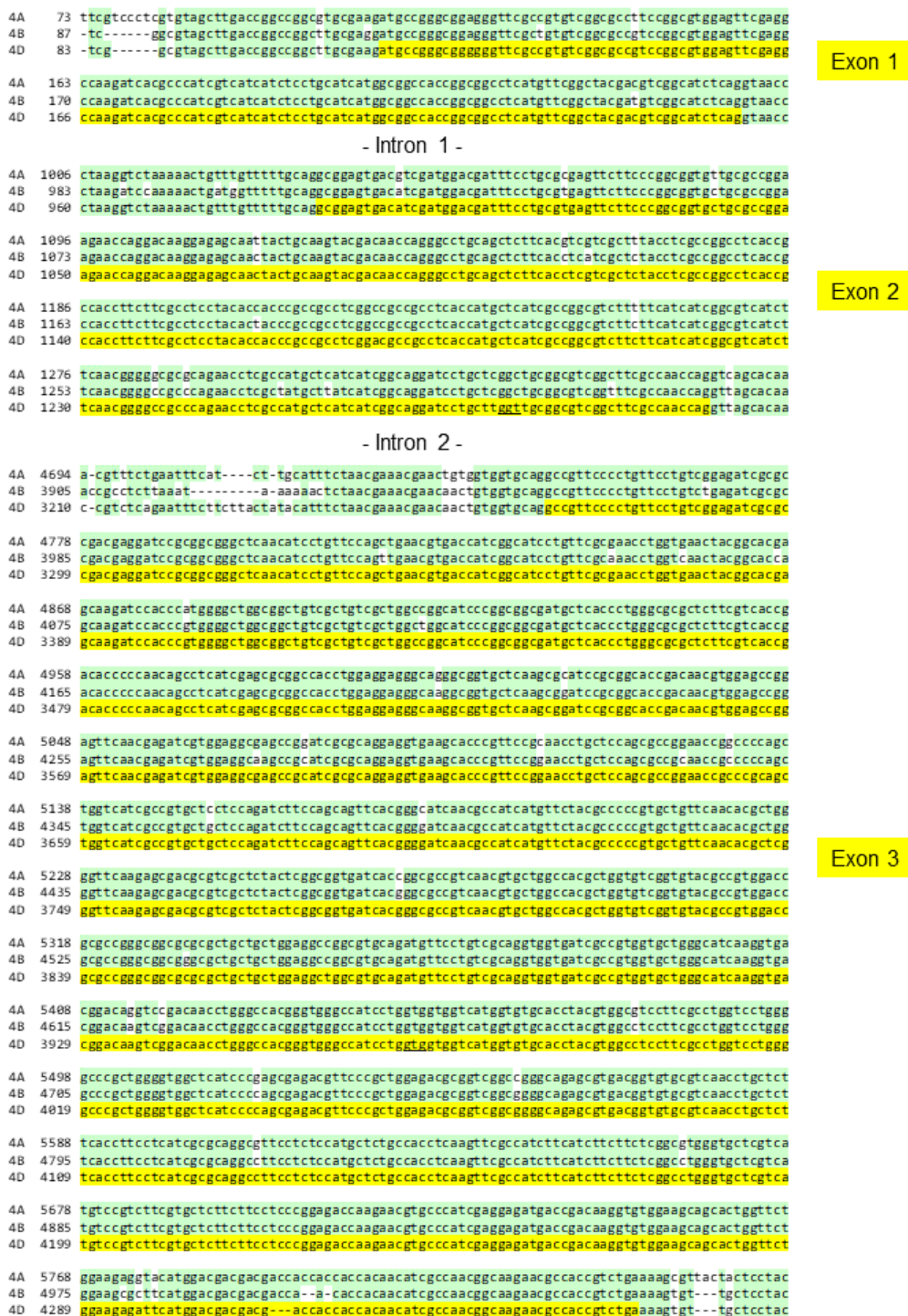


Abbildung 21: Alignment der drei *Lr67*-Homeoallele Jeweils das erste, zweite und dritte Exon von *Lr-A67*, *Lr-B67* und *Lr-D67* werden in einem *Alignment* miteinander verglichen. Die Sequenzinformationen stammen von EnsemblPlants und sind basierend auf der Sorte ‚Chinese Spring‘ (<https://plants.ensembl.org>).

Zudem wurden Übereinstimmungen von 99,7 % auf dem Chromosom 4B (*TraesCS4B02G243500*) und 98,9 % auf dem Chromosom 4A (*TraesCS4A02G066200*) gefunden. Das *Alignment* der drei Chromosomenbereiche ist in Abbildung 21 dargestellt. Die bei UniProt hinterlegten Proteininformationen bestätigten, dass die drei Homeoallele für membranlokalisierte Zuckertransporter codieren, die zu den MFS-Transportern gehören und 12 Transmembrandomänen haben (www.uniprot.org/uniprot/W5ELX6; www.uniprot.org/uniprot/W5E2A1; www.uniprot.org/uniprot/W5DXY9; 25.10.18). Die Proteinsequenzen der drei Homeoallele sind zu 99 % identisch und alle haben an der Position 144 die Aminosäure Glycin und somit die Wildtyp-Allele (Abbildung 22). Bisher wurde nicht beschrieben, ob Mutationen in *Lr-A67* oder *Lr-B67* ebenfalls zu einer Resistenz führen. Um festzustellen, ob die Sequenzinformationen von Moore et al. (2015), NCBI und EnsemblPlants mit den in dieser Arbeit verwendeten Weizen-Zuchtlinie ‚Bobwhite‘ und Sorte ‚Taifun‘ übereinstimmen, wurden die drei Exons von *Lr-A67*, *Lr-B67* und *Lr-D67* beider Sorten mittels Allel-spezifischer Primer amplifiziert und sequenziert. Dabei wurde festgestellt, dass beide Sorten die Wildtyp-*Lr67*-Allele auf allen drei Genomen haben. Ziel dieser Arbeit war es in den beiden anfälligen Sorten *Lr67* zu mutieren, um entweder die bereits bekannte Mutation zu etablieren oder neue Resistenz-vermittelnde Mutationen zu entdecken.

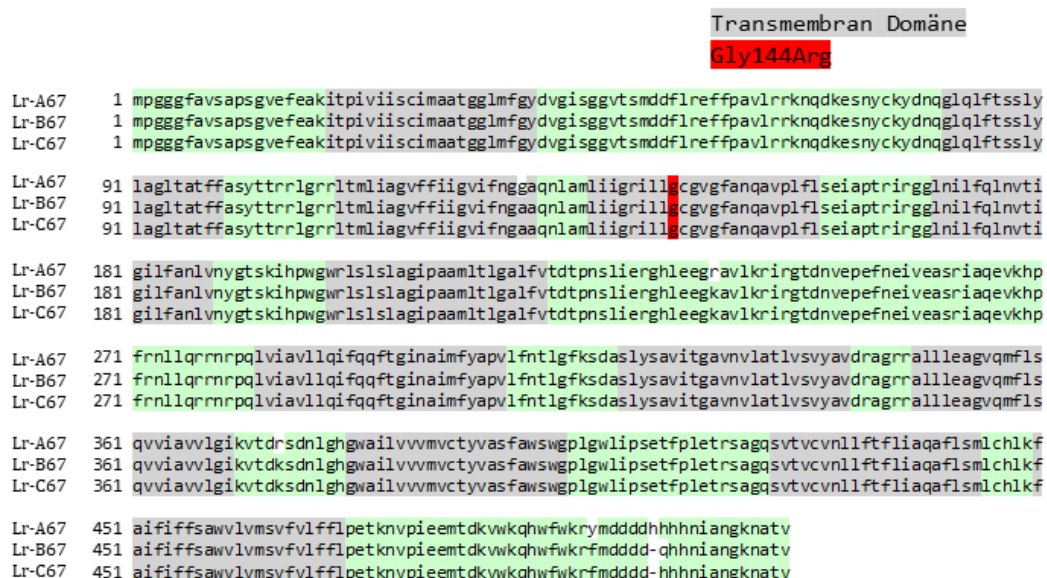


Abbildung 22: Lr67 Protein-Alignment Die Proteinsequenzen von Lr-A67, Lr-B67 und Lr-D67 sind zu 99 % identisch. Die 12 Transmembrandomänen sind grau markiert und die Aminosäure Glycin 144 ist rot markiert. Basierend auf den Proteininformationen von UniProt (www.uniprot.org)

3.2.1. Gezielte Mutagenese von einzelnen Zielmotiven mit gRNA/cas9-Standardvektoren

Im ersten Versuch wurden sieben gRNAs ausgewählt, deren Zielmotive im zweiten und dritten Exon von *Lr67* positioniert waren (Abbildung 23). Bei der Auswahl der gRNAs wurde auf möglichst hohe von den *Online Tools* vorhergesagte Effizienzen/Aktivitäten der gRNAs sowie auf deren Sekundärstrukturen geachtet. Des Weiteren wurden Zielmotive entweder in der Nähe des ersten oder zweiten SNPs ausgewählt. Die gRNAs wurden jeweils einzeln in den generischen Vektor pSH179 kloniert. In diesem Vektor sind die gRNAs unter der Kontrolle des *TaU6*-Promotors und die Cas9 ist unter der Kontrolle des *2x35S*-Promotors. Die Effizienz der gRNAs wurde in dem bereits weiter oben beschriebenen biolistischen Testsystem validiert. Hierfür wurden zusätzlich sieben Zielvektoren generiert, die jeweils mit dem dazugehörigen gRNA/*cas9*-Expressionsvektor und dem *mCherry*-Kontrollvektor co-transformiert wurden. Die rot und gelb fluoreszierenden Zellen wurden ausgezählt und aus dem Verhältnis die Mutationseffizienz berechnet (Abbildung 23C). Die beiden effizientesten gRNAs waren Lr67-gRNA1 und -gRNA4, die ihre Zielmotive in der Nähe des G144R-verursachenden SNP (gRNA1) bzw. im dritten Exon (gRNA4) haben. Tendenziell lagen die Effizienzen der ersten vier gRNAs dicht beieinander. Die von den *Online Tools* vorhergesagten Effizienzen der gRNAs waren sehr unterschiedlich, wobei die auf transienter Expression beruhende Validierung eine davon deutlich abweichende Rangfolge ergab.

Für die erste stabile Weizentransformation WI1 wurden die Konstrukte mit der gRNA1 und gRNA4 ausgewählt. Es wurden 80 Pflanzen regeneriert, aber nur in einer Pflanze konnte mittels PCR das *hpt*-Gen für die Hygromycin-Resistenz nachgewiesen werden (Tabelle 13). Es wurden jedoch mittels Sanger-Sequenzierung der Zielmotive keine Mutationen gefunden. Für das zweite Experiment WI3 wurden die Konstrukte mit der gRNA1 und gRNA5 ausgewählt und co-transformiert. Von den 38 regenerierten Pflanzen war wiederum eine Pflanze (WI3E33) PCR-positiv für das *hpt*-Gen.

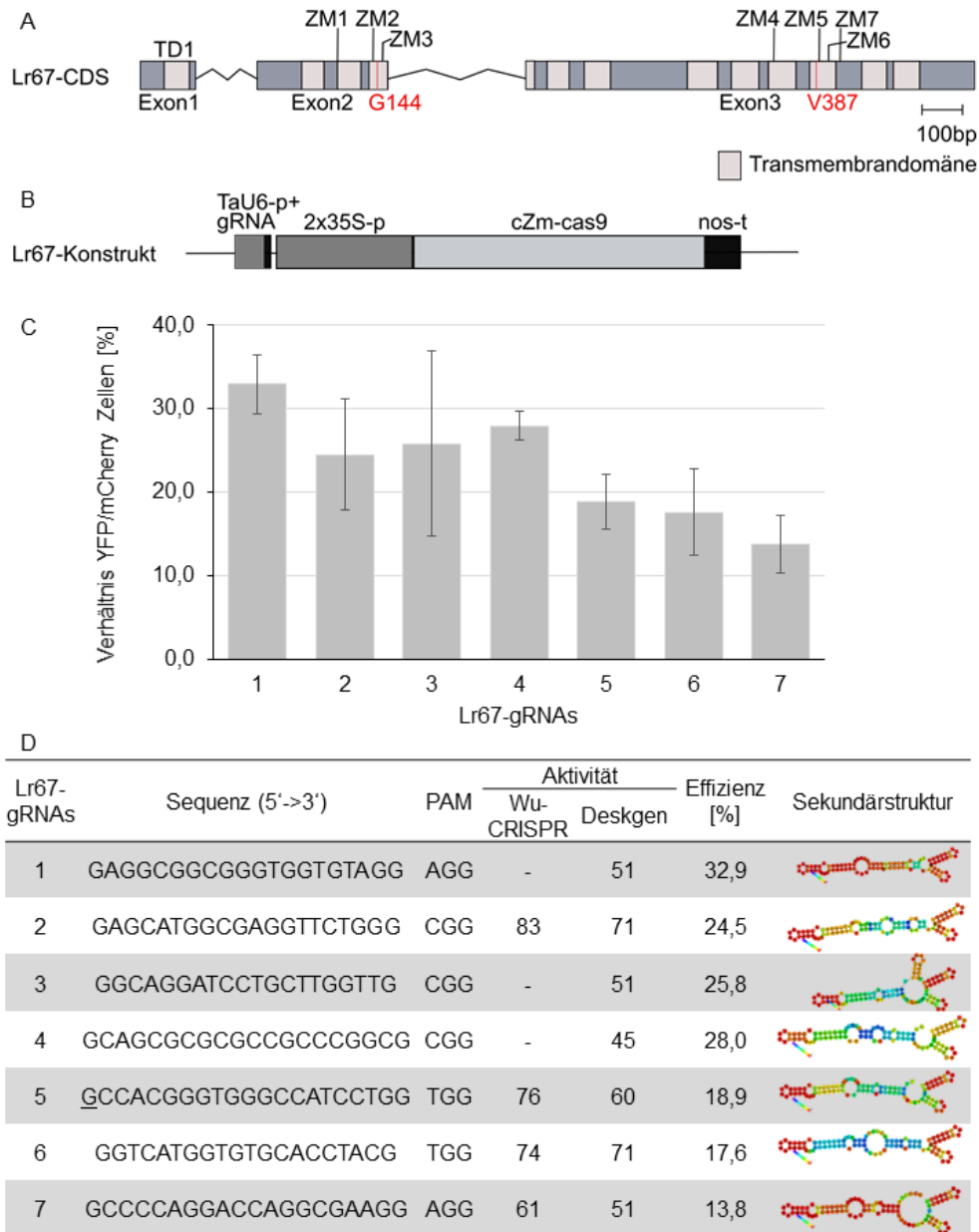


Abbildung 23: Lr67 gRNA-Validierung (A) Grafische Darstellung des *Lr67*- Gens mit den G144R und V387L verursachenden SNPs und den Zielmotiven der ausgewählten gRNAs. (B) Beispielhaft wird der Aufbau eines *Lr67*-Konstrukts basierend auf pSH179 gezeigt. (C) Das Verhältnis von YFP- zu mCherry-fluoreszierenden Zellen spiegelt die Mutationseffizienz der jeweiligen gRNA wider. (D) Die Aktivitäten der gRNAs wurden anhand der *Online Tools* Wu-CRISPR und Deskgen vorhergesagt und die Sekundärstrukturen mit dem *Tool* RNA Webfold modelliert. Ein unterstrichenes G stellt ein nicht-bindendes Guanin-Nukleotid dar.

Tabelle 13: Analytierte WI1- und WI3-Pflanzen

Experiment	Genotyp	Methode	Ziel-motive	Analysierte T0 Pflanzen	hpt ⁺	Mutanten
WI1	Bobwhite	Biolistik	1+4	80	1	0
WI3	Bobwhite	Biolistik	1+5	38	1	1

Laut Sanger-Sequenzierung wies die Pflanze WI3E33 sowohl im ersten als auch im fünften Zielmotiv Mutationen auf. Im Chromatogramm der Zielmotive war zu erkennen, wo die Cas9 die Doppelstrangbrüche induziert und eine fehlerhafte Reparatur stattgefunden hatte. Bis zu den Schnittstellen war das Chromatogramm eindeutig, d.h. es waren einzelne saubere Peaks zu erkennen. Erst ab der Schnittstelle der Cas9 traten fortlaufend Doppelpeaks auf, was darauf hinwies, dass mindestens zwei verschiedene Sequenzvarianten vorhanden waren, mindestens eines der beiden Allele des D-Subgenoms eine vom Wildtyp abweichende Sequenz aufwies und die Pflanze diesbezüglich heterozygot/ chimär war (Abbildung 24).

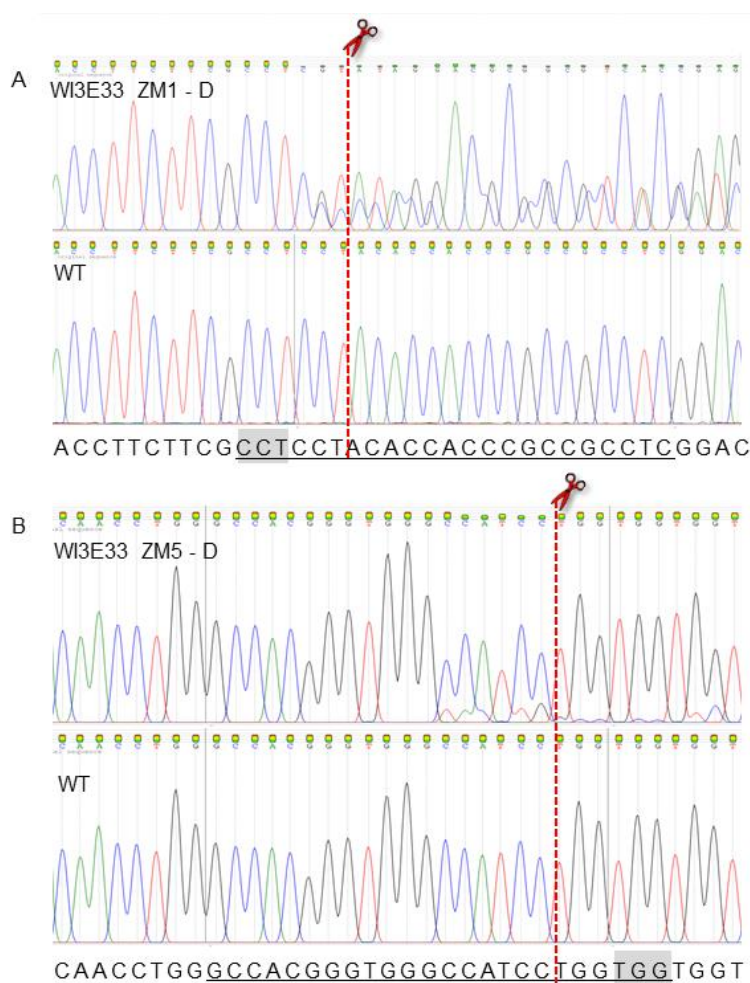


Abbildung 24: Mutierte Sequenzen in der Pflanze WI3E33 (A) Sequenzen vom Zielmotiv 1 in WI3E33 und ‚Bobwhite‘ Wildtyp. (B) Sequenzen vom Zielmotiv 5 in WI3E33 und ‚Bobwhite‘ Wildtyp. Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Doppelpeaks weisen auf mindestens zwei verschiedene Sequenzen an diesen Stellen hin. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt.

In der nächsten Generation wurden 19 Nachkommen von WI3E33 analysiert (Tabelle 14). 16 Pflanzen waren PCR-positiv für die *hpt*-Kassette und in 17 Pflanzen konnten Mutationen in den Zielmotiven detektiert werden.

Tabelle 14: Analyisierte WI3-T₁-Pflanzen

Experiment	Genotyp	Zielmotiv	Genom	Analyisierte T ₁ -Pflanzen	hpt ⁺	Mutanten
WI3 T ₁	Bobwhite	1	A,D	19	16	17
		5	A,B,D			

Beispielhaft werden in Abbildung 25A die Sequenzen des Zielmotivs 1 von vier Nachkommen der Pflanze WI3E33 (WI3E33-1 bis WI3E33-5) gezeigt. Zehn Pflanzen hatten bereits eine homozygote 14 bp-Deletion im Zielmotiv 1 des *Lr67*-Gens im D-Genom. Sieben Pflanzen hatten in diesem Zielmotiv eine heterozygote Mutation und nur zwei Pflanzen waren nicht mutiert. Überraschenderweise waren in dem Zielmotiv 1 des B-Genoms ebenfalls Mutationen aufgetreten, obwohl die gRNA1 nicht zu 100 % identisch zu Zielmotiv 1 in diesem Genom war (eine Fehlpaarung/ *Mismatch* an der Position 13). Es trat entweder eine homozygote 16 bp-Deletion auf oder die Pflanzen waren heterozygot/chimär, wobei im *Alignment* zu erkennen war, dass bei einigen Pflanzen auf einem Allel ebenfalls eine 16 bp-Deletion vorlag. Beim A-Genom traten ebenfalls Mutationen im Zielmotiv 1 auf. Hier kam eine 6 bp-Deletion am häufigsten vor. Für das Zielmotiv 5 des D-Genoms waren die 17 Pflanzen heterozygot/chimär. Die Homeoallele der A- und B-Genome waren in diesen Fällen nicht mutiert.

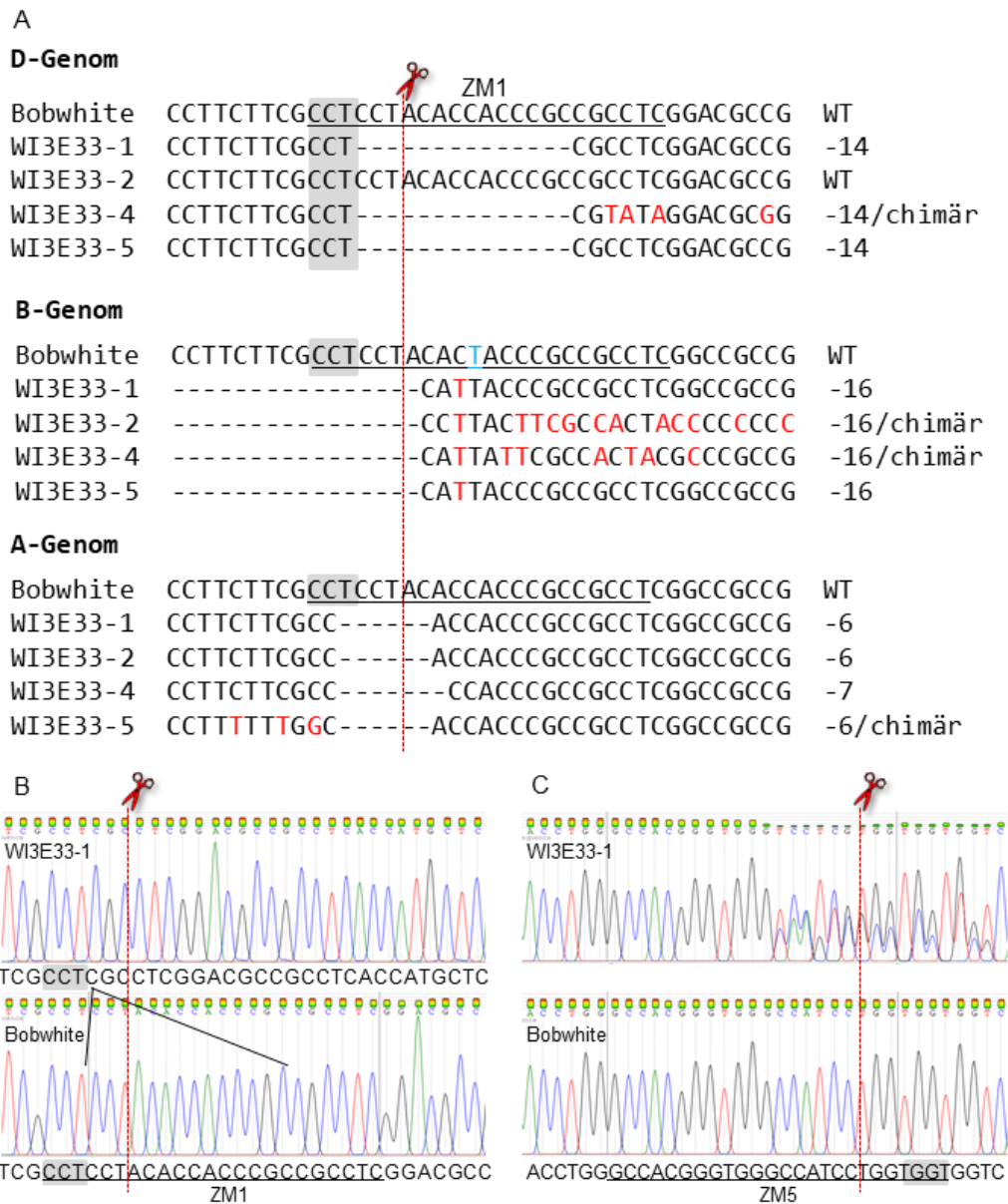


Abbildung 25: Mutationen in den A-, B- und D-Genomen der WI3 T₁-Pflanzen (A) Mutationenmuster im ersten Zielmotiv der D-, B- und A-Genome (B) Chromatogramm der ersten Zielregion des D-Genoms vom Wildtyp und der Mutante WI3E33-1 (C) Chromatogramm der fünften Zielregion des D-Genoms vom Wildtyp und der Mutante WI3E33-1. Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt. Rote und blaue Buchstaben markieren *Mismatches*.

Um bezüglich des Zielgens eine weitere genetische Variabilität zu erzeugen, wurde die Mutante WI3E33 mit dem Wildtyp gekreuzt (Tabelle 15). Dafür wurden ‚Bobwhite‘-Pflanzen emaskuliert und mit Pollen von WI3E33 bestäubt. Insgesamt waren aus diesen Kreuzungen 27 Pflanzen hervorgegangen. Von diesen waren 20 Pflanzen PCR-positiv für die *hpt*-Kassette und 15 Pflanzen in beiden Zielmotiven des D-Genoms heterozygot/chimär mutiert.

Tabelle 15: Übersicht der Kreuzungen von WI3E33 mit dem Wildtyp

Experiment	Eltern	24 °C Inkubation 1d nach Bestäubung	Geerntete Körner	Analysierte Pflanzen	hpt +	Mutanten
WI3-X1	Bobwhite x WI3E33	4d	6	6	4	2
WI3-X2	Bobwhite x WI3E33	4d	6	6	6	3
WI3-X3	Bobwhite x WI3E33	-	7	5	5	3
WI3-X4	Bobwhite x WI3E33	-	6	5	3	3
WI3-X5	Bobwhite x WI3E33	-	1	1	1	0
WI3-X6	Bobwhite x WI3E33	4d	4	4	1	3

3.2.2. Simultane Mutagenese von mehreren Zielmotiven mit Vektoren des CasCADE-Systems

Für die weiteren Experimente wurden Vektoren aus dem modularen Vektorsystem für die gezielte Mutagenese von *Lr67* verwendet. Zunächst wurden acht weitere gRNAs ausgewählt, deren Zielmotive in den codierenden Bereichen für die dritte, vierte oder fünfte *Lr67*-Transmembrandomäne lagen (Abbildung 26A). Diese Zielmotive wurden so gewählt, da der G144R-verursachende SNP in der vierten Transmembrandomäne lokalisiert ist und die Chance bestand, dass Mutationen in den umliegenden Transmembrandomänen ebenfalls zu einem dominanten Effekt führen und Auswirkungen auf den Zuckertransport haben könnten. Neben den bereits beschriebenen Kriterien zur Auswahl von gRNAs wurde darauf geachtet, dass die gRNAs in der vierten Transmembrandomäne (*Lr67*-gRNA10 bis gRNA12 und gRNA3) ihre Zielregionen entweder direkt am oder in der Nähe des G144R verursachenden SNPs hatten. Bei der Auswahl dieser vier speziellen gRNAs wurden daher auch suboptimale Sekundärstrukturen oder als geringer vorhergesagte gRNA-Aktivitäten toleriert.

Im ersten Schritt zur Herstellung entsprechender Vektoren wurden die acht gRNAs in die Generischen gRNA-Modulvektoren pIK5 bis pIK8 kloniert. Im zweiten Schritt wurden die gRNA-Vektoren in zwei verschiedenen Kombinationen miteinander assembliert, um diese dann im dritten Schritt mit einem Endonuklease-Vektor zu kombinieren. So wurden zwei Konstrukte mit unterschiedlichen gRNA-Kombinationen erzeugt (Abbildung 26C). Für die Weizentransformation wurden die Expressionseinheiten jeweils in den Generischen Binärvektor p6i-2x35s-TE9 kloniert.

Dieser enthielt neben den *Left Border* (LB)- und *Right Border* (RB) -Sequenzen der agrobakteriellen T-DNA auch ein *hpt*-Gen für eine Hygromycin-Selektion transgener Pflanzen.

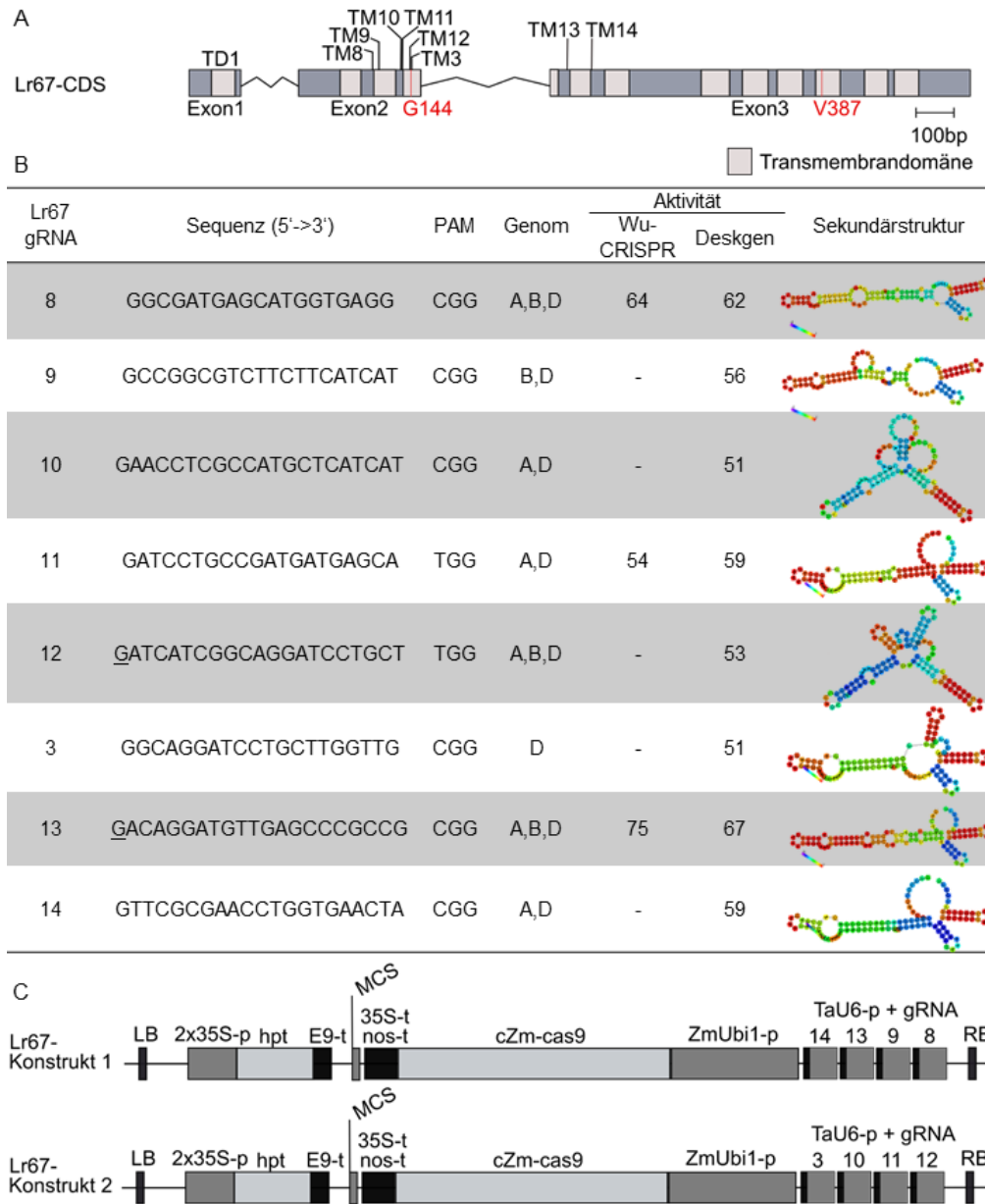


Abbildung 26: Die Zielmotive des Lr67-Multiplex-Ansatzes (A) Schematische Darstellung der Lr67-CDS und die Zielmotive 8 bis 14. (B) Auswahl der gRNAs. Unterstrichene Nukleotide stellen eine nicht mit dem Zielmotiv übereinstimmende Base der gRNA dar, die zur Ergänzung eines Transkriptionsstarts eingefügt wurde. (C) Darstellung der beiden Binärvektoren für die Transformation

Die beiden Konstrukte wurden zunächst jeweils dreimal für die biolistische Transformation von Weizen (‚Bobwhite‘ und ‚Taifun‘) verwendet. Diese in Tabelle 16 gelisteten Experimente unterschieden sich bezüglich der verwendeten Genotypen und der Hygromycingehalte in den Kallus-Induktionsmedien und Regenerationsmedien

(s.Abschnitt 2.2.20.1.), die nach dem biolistischen DNA-Transfer aufeinander folgend verwendet wurden. In diesem Zusammenhang wurde auch getestet, ob der bisher nicht verwendete Genotyp ‚Taifun‘ transformiert werden kann. Insgesamt wurden in diesen sechs Experimenten (WI7 bis WI12) über 3.060 Pflanzen regeneriert. Von jedem Experiment wurden ca. 190 Pflanzen durch PCR-*Screenings* auf das Transgen (*hpt*) und mittels Sequenzierung von Amplikons der Zielmotive analysiert. Dafür wurde zuerst genomische DNA aus Blattproben extrahiert und die Zielmotive der gRNAs im zweiten Exon amplifiziert. Anschließend wurden diese Amplikons tiefensequenziert. Für die Amplikonsequenzierung und die anschließende Auswertung sind Fragmentgrößen von ca. 250 bp vorteilhaft. Durch die eingeschränkte Amplikongröße konnte keine Primerkombination gefunden werden, die in allen drei Genomen bindet. Für die ersten *Screenings*, in denen sehr viele Pflanzen auf Mutationen überprüft wurden, lag das Hauptaugenmerk auf der Detektion von Mutationen im zweiten *Lr67*-Exon des D-Genoms. Dementsprechend wurde die Primerkombination vorrangig für das D-Genom ausgewählt. Bei der Anwendung stellte sich heraus, dass diese Primer auch im B-Genom binden, sodass im gleichen Ansatz auch hier Mutationen detektiert werden konnten. Anhand der Sequenzierungsergebnisse hat sich gezeigt, dass für Konstrukt 1 das Experiment WI8 mit 13 mutierten Pflanzen am erfolgreichsten war. Für Konstrukt 2 war mit vier mutierten Pflanzen das Experiment WI10 am erfolgreichsten.

Tabelle 16: Übersicht der Weizentransformations-Experimente WI7 bis WI12

Experiment	Genotyp	Methode	Konstrukt	Analysierte To-Pflanzen	hpt ⁺	Mutanten
WI7	Bobwhite	Biolistik	1	190	-	4
WI8	Taifun	Biolistik	1	190	15	13
WI9	Bobwhite	Biolistik	2	192	9	0
WI10	Taifun	Biolistik	2	192	13	4
WI11	Bobwhite	Biolistik	1	192	4	4
WI12	Bobwhite	Biolistik	2	192	5	2

Beispielhaft werden in Abbildung 27 die Sequenzvarianten mit der höchsten Anzahl an Sequenzier-*Reads* der Pflanzen WI8E12 und WI10E40 gezeigt. Für WI8E12 werden die Zielmotive 8 und 9 im D- bzw. B-Genom gezeigt. Die Zielmotive 13 und 14 wurden nicht sequenziert. Im Fall von WI8E12 wiesen 80 % der *Reads* vom B-Genom Mutationen auf. Es konnten unterschiedliche Mutationen detektiert werden, was darauf hindeutet, dass

die Pflanze chimär war. Auf dem D-Genom wiesen 70 % der *Reads* Mutationen auf. Hier war die häufigste Mutation eine 30 bp-Deletion von Zielmotiv 8 bis 9.

Im Experiment WI10 wurde das Konstrukt 2 verwendet dessen gRNAs ihre Zielmotive im zweiten Exon haben. In der Pflanze WI10E40 wiesen im B-Genom 36 % der *Reads* Mutationen auf und im D-Genom 60 % der *Reads*.

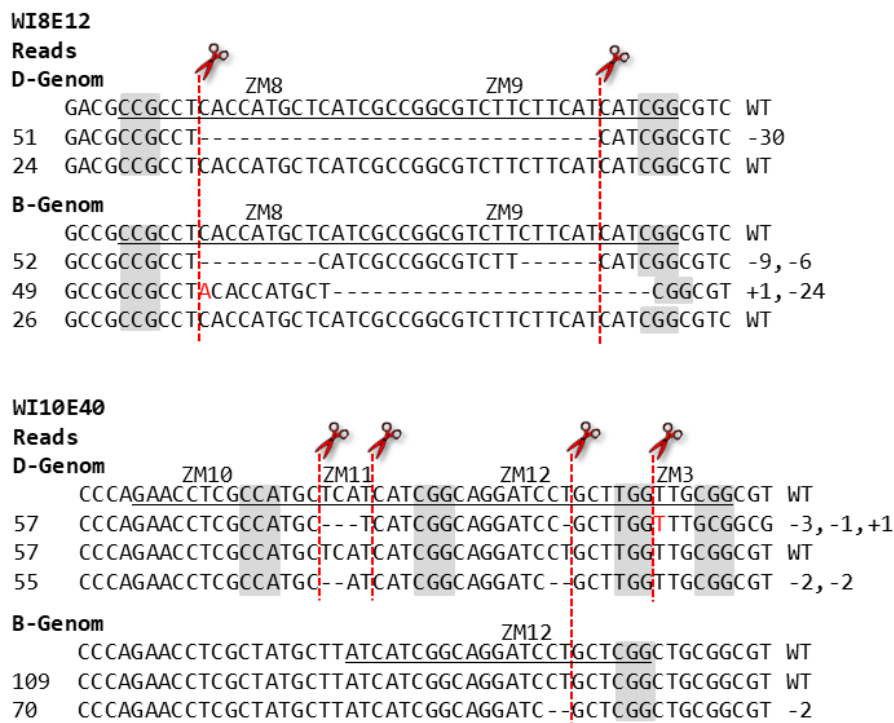


Abbildung 27: Ergebnisse der Amplikon-Tiefensequenzierung von Zielregionen der Pflanzen WI8E12 und WI10E40 Es werden jeweils die zwei bis drei Sequenzvarianten gezeigt, die durch die meisten *Reads* repräsentiert waren. Die Zahl auf der linken Seite gibt die Anzahl der *Reads* einer Sequenz an. Auf der rechten Seite der Sequenz steht jeweils die Art der Mutation (WT: Wildtyp; -1: Anzahl deletierter Basen; +1: Anzahl eingefügter Basen). Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt.

Von fünf primärmutierten Pflanzen wurden die Nachkommenschaften hinsichtlich Mutationen in den Zielmotiven und Präsenz des Transgens analysiert (Tabelle 17). Die bereits in der T₀-Generation gefundenen Mutationen wurden in die nächste Generation (T₁) vererbt. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass das Transgen segregierte. So waren bspw. alle 19 analysierten Nachkommen der Pflanze WI8E12 mutiert, aber in nur vier Pflanzen ließ sich mittels PCR das *hpt*-Gen nachweisen.

Tabelle 17: Analyierte WI8- und WI10-T₁-Pflanzen

Pflanze	Konstrukt	Mutierte Reads (%)	Analysierte T ₁ -Pflanzen	hpt ⁺	Mutanten
WI8E12	1	86	19	4	19
WI8E16	1	31	17	2	15
WI8E29	1	13	19	12	14
WI10E16	2	5	19	10	13
WI10E40	2	60	17	1	12

Beispielhaft wird Abbildung 28 das Ergebnis der Amplikon-Tiefensequenzierung der Pflanze WI8E12-1 gezeigt. Für die Sequenzierung wurden dieselben Primer wie für das *Screening* der T₀-Generation verwendet. Wie bereits weiter oben erwähnt, bindet diese Primerkombination sowohl im D- als auch im B-Genom. Für die Zielmotive 8 und 9 waren im D-Genom 86 % der *Reads* mutiert und im B-Genom 88 %. Im D-Genom trat die 30 bp-Deletion zwischen den Zielmotiven 8 und 9 wieder am häufigsten auf. Im B-Genom gab es zwei Mutationsmuster, die mit vergleichbarer Häufigkeit auftraten. Dies spricht dafür, dass die Pflanze in dieser Zielregion heterozygot war. Auch im dritten Exon waren im Zielmotiv 13 Mutationen sowohl im D- als auch im B-Genom aufgetreten. Bei dieser Pflanze wurden hauptsächlich kleinere Deletionen (1 bis 3 bp) detektiert.

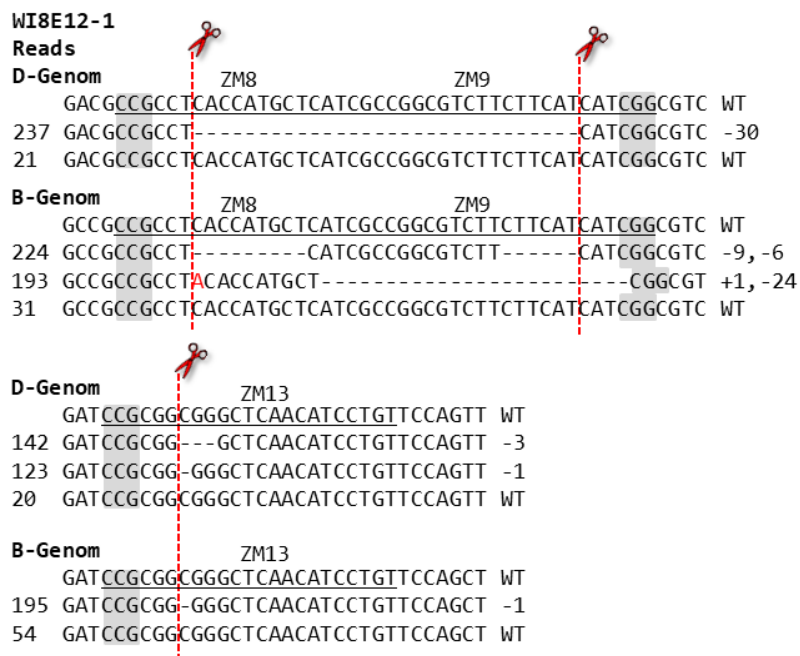


Abbildung 28: Ergebnisse der Amplikon-Tiefensequenzierung von Zielregionen der Pflanze WI8E12-1 Es werden jeweils die zwei bis drei *Sequenzvarianten* mit den meisten *Reads* angezeigt. Die Zahl auf der linken Seite gibt die Anzahl der *Reads* einer Sequenz an. Auf der rechten Seite der Sequenz steht jeweils die Art der Mutation (WT: Wildtyp; -1: Anzahl deletierter Basen; +1: Anzahl eingefügter Basen). Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt

Ein detaillierterer Überblick der T₁-Generation ist in Abbildung 29 dargestellt. Beispielhaft werden vier Nachkommen der Pflanze WI8E12 und jeweils ein Nachkomme der Pflanzen WI8E16 und WI8E29 gezeigt. Ausnahmslos alle Mutanten (48) der T₁-Generation aus Experiment WI8 hatten im D-Genom eine 30 bp-Deletion zwischen den Zielmotiven 8 und 9. Etwas vielfältiger waren die Mutationsmuster im B-Genom. Im Zielmotiv 8 war die häufigste Mutation eine 9 bp-Deletion, gefolgt von einer 1 bp-Insertion. Im Zielmotiv 9 trat eine 6 bp-Deletion am häufigsten auf, gefolgt von einer 24 bp-Deletion. Die Mutationsraten (Anteil der Sequenzier-*Reads* mit Mutationen) war bei den Nachkommen der Pflanze WI8E12 mit durchschnittlich 71 % deutlich höher als bei den Nachkommen der Pflanzen WI8E16 und WI8E29 mit durchschnittlich 9 % bzw. 13 %.

		ZM8		ZM9		Anteil der mutierten Reads	
D-Genom		<u>GACGCCGCCTCACCATGCTCATCGCCGGCGTCTTCTTCATCATCGGCGTC</u> WT					
WI8E12-7		GACGCCGCCT-----CATCGGCGTC		-30		65 %	
WI8E12-8		GACGCCGCCT-----CATCGGCGTC		-30		82 %	
WI8E12-16		GACGCCGCCT-----CATCGGCGTC		-30		82 %	
WI8E12-17		GACGCCGCCT-----CATCGGCGTC		-30		79 %	
WI8E16-2		GACGCCGCCT-----CATCGGCGTC		-30		28 %	
WI8E29-3		GACGCCGCCT-----CATCGGCGTC		-30		64 %	
B-Genom		<u>GCCGCCGCCTCACCATGCTCATCGCCGGCGTCTTCTTCATCATCGGCGTC</u> WT					
WI8E12-7		GCCGCCGCCTACACCATGCT-----CGGCGT		+1, -24		87 %	
WI8E12-8		GCCGCCGCCT-----CATCGCCGGCGTCTT-----CATCGGCGTC		-9, -6		82 %	
WI8E12-16		GCCGCCGCCT-----CATCGCCGGCGTCTT-----CATCGGCGTC		-9, -6		81 %	
WI8E12-17		GCCGCCGCCTACACCATGCT-----CGGCGT		+1, -24		80 %	
WI8E16-2		GCCGCCGCCT-ACCATGCTCATCGCCGGCGTCTTCTTCATCATCGGCGTC		-1		69 %	
WI8E29-3		GCCGCCGCCT-----CATCGCCGGCGTCTT-----CATCGGCGTC		-9, -6		3 %	
D-Genom		<u>GATCCGCGGGGGCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC</u> WT					
WI8E12-7		GATCCGCGG-GGGCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC		-1		27 %	
WI8E12-8		GATCCG-----//-----CGGC		-69		40 %	
WI8E12-16		GATCCG-----//-----CGGC		-69		46 %	
WI8E12-17		GATCCGCGG-GCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC		-3		73 %	
WI8E16-2		GA-----TCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC		-24		85 %	
WI8E29-3		GATCCG-----//-----CGGC		-69		75 %	
B-Genom		<u>GATCCGCGGGGGCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC</u> WT					
WI8E12-7		GATCCGCGG-GCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC		-3		84 %	
WI8E12-8		GATCCGCGG-GGGCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC		-1		70 %	
WI8E12-16		GATCCGCGG-GGGCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC		-1		81 %	
WI8E12-17		GATCCGCGG-GGGCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC		-1		76 %	
WI8E16-2		GATCCGCGG-GCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC		-3		34 %	
WI8E29-3		GATCCGCGG-GGGCTCAACATCCTGTTCC-/-TGTTGCGAACCTGGTGAACACGGC		-1		64 %	

Abbildung 29: Repräsentative Ergebnisse der Amplikon-Tiefensequenzierung von Zielregionen der WI8 T₁-Pflanzen Es wird jeweils die Sequenzvariante mit dem höchsten Anteil an mutierten *Reads* angezeigt. Auf der rechten Seite der Sequenz steht jeweils die Art der Mutation (WT: Wildtyp; -1: Anzahl deletierter Basen; +1: Anzahl eingefügter Basen) und daneben der Anteil der gesamten *Reads* mit Mutationen an der Gesamtzahl der Sequenzier-*Reads*. Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt

Vier der WI8E12 und zwei der WI8E29-Nachkommen wurden mit Allel-spezifischen Primern auch mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Beispielhaft werden die Sanger-Sequenzierungsergebnisse der Pflanzen WI8E12-1 und WI8E29-3 in Tabelle 18 dargestellt. Die Pflanze WI8E12-1 hatte im A-Genom homozygote Mutationen in den Zielmotiven 8 und 13. Außerdem deuten die Ergebnisse daraufhin, dass diese Pflanze im B-Genom darüber hinaus biallelisch bzw. chimär war, da Doppelpeaks in den Chromatogrammen auf Höhe der Zielmotive detektiert wurden. Im D-Genom wurde wieder die homozygote 30 bp-Deletion zwischen den Zielmotiven 8 und 9 detektiert. Interessanterweise wurde bei der Pflanze WI8E12-1 im Zielmotiv 14 im D-Genom eine homozygote 109 bp-Insertion gefunden. Diese trat auch bei einem weiteren Nachkommen der Pflanze WI8E12 (WI8E12-4) auf. Eine BLAST-Suche dieser 109 Basenpaare hat ergeben, dass es sich um ein Fragment des Transformationsvektors pIK138 handelte. Für die weitere Vermehrung werden daher Pflanzen verwendet, die nicht diese Insertion haben.

Anhand der Sanger-Sequenzierung war zu sehen, dass die Pflanze WI8E29-3 im D-Genom heterozygot war. Jedoch ließ sich in einem *Alignment* mit dem Wildtyp erahnen, dass sie, wie die anderen Pflanzen aus dieser Familie, eine 30 bp-Deletion zwischen den Zielmotiven 8 und 9 und eine 69 bp-Deletion zwischen den Zielmotiven 13 und 14 aufwies. Im B-Genom wurde nur im Zielmotiv 13 eine Mutation detektiert. Das A-Genom wurde von der Amplikon-Tiefensequenzierung nicht abgedeckt. Bei der Sanger-Sequenzierung hat sich gezeigt, dass homozygote 3 bp- und 1 bp-Insertionen in den Zielmotiven 8 und 13 aufgetreten waren.

Tabelle 18: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der Zielregionen von WI8E12-1 und WI8E29-3

Pflanze	Mutationen im Zielmotiv 8/9/13/14 D	Mutationen im Zielmotiv 8/9/13/14 B	Mutationen im Zielmotiv 8/9/13/14 A
WI8E12-1	-30/-30/+1/+109	ht/ht/ht/WT	-7/WT/-1/WT
WI8E29-3	ht/ht/ht/ht	WT/WT/ht/WT	+3/WT/+1/WT

ht: heterozygot; WT: Wildtyp

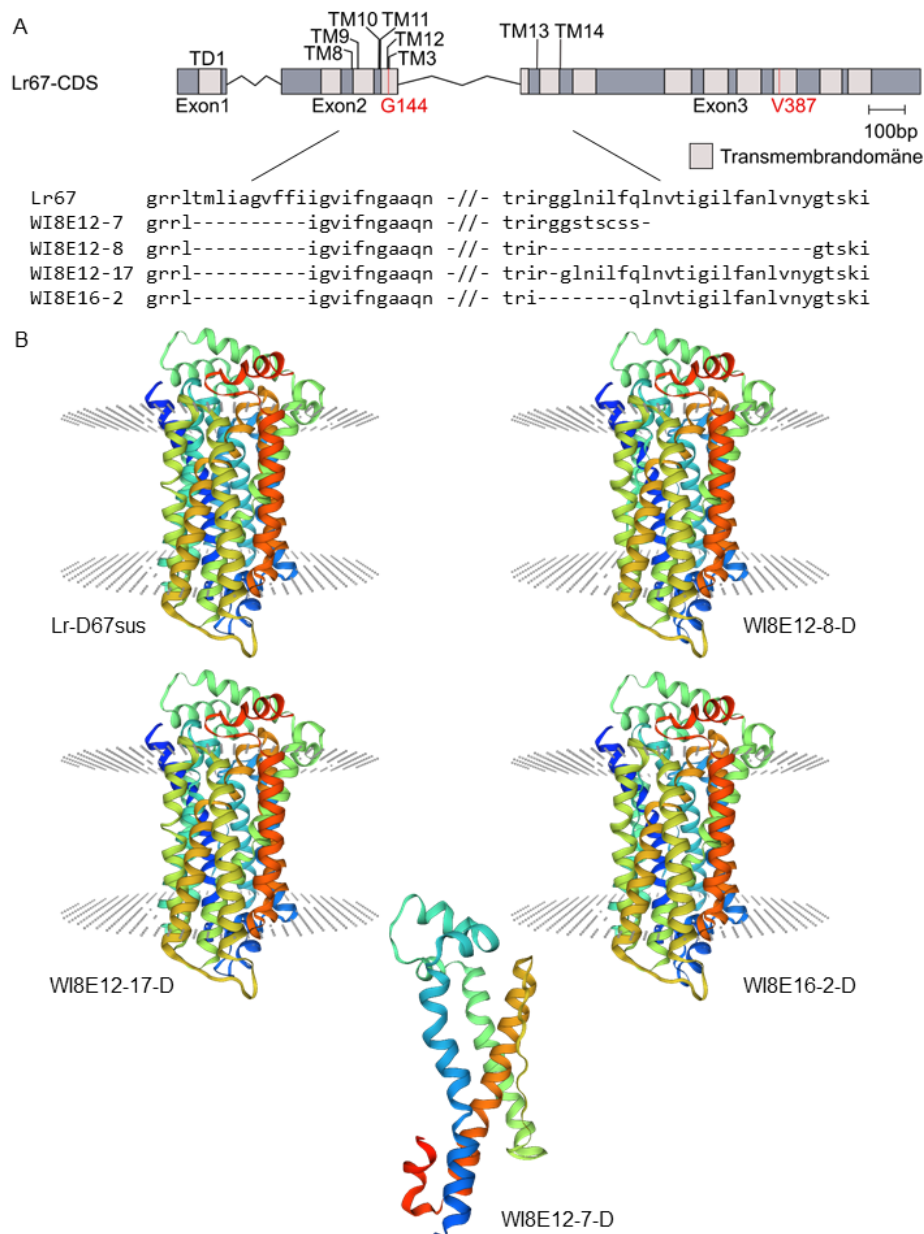


Abbildung 30: Modellierung der Proteinstruktur von Lr67 der WI8-T₁-Nachkommen (A) Im Bereich der Zielregionen werden die Proteinsequenzen ausgewählter Mutanten dargestellt. (B) Die Proteinstrukturen wurden mit dem Expsy *Tool* erstellt. <https://swissmodel.expasy.org/>

Mit dem Expsy/Swiss-Model *Online Tool* (Universität Basel; <https://swissmodel.expasy.org/>) ließen sich die Proteinstrukturen der mutierten *Lr67*-Varianten vorhersagen. Beispielhaft wurde die Proteinstruktur von Lr-D67 von vier unterschiedlichen Nachkommen der Primärmutanten WI8E12 untersucht (Abbildung 30). Alle vier Pflanzen hatten laut Amplikon-Tiefensequenzierung eine 30 bp-Deletion zwischen den Zielmotiven 8 und 9 in der dritten Transmembrandomäne. Diese Mutation führte zum Verlust von zehn Aminosäuren, was circa der Hälfte der dritten Transmembrandomäne entspricht, wobei der Leserahmen erhalten blieb. Bei der Pflanze WI8E12-7 kam es durch die Deletion im Zielmotiv 13 dagegen zur Verschiebung des

Leserasters in der fünften Transmembrandomäne und damit zu sechs veränderten Aminosäuren ab Zielmotiv 13 bis zu einem frühzeitigen Stopcodon an Position 165. Dies führte zu dem Verlust von 350 Aminosäuren und auch zu einer komplett veränderten Proteinstruktur. Die anderen drei Mutanten hatten in der fünften Transmembrandomäne ebenfalls Mutationen, die jedoch nicht zu einer Verschiebung des Leserasters, sondern nur zum Verlust von ein (WI8E12-17) bis 23 Aminosäuren (WI8E12-8) führten. Bei der Pflanze WI8E12-8 (-23 Aminosäuren) fehlte beispielsweise die gesamte fünfte Transmembrandomäne. Auch in dem vorhergesagten Proteinmodell von WI8E12-8 konnten nur zehn intakte Transmembrandomänen gezählt werden.

Beispielhaft für das Experiment WI10 werden in Abbildung 31 die am häufigsten auftretenden *Reads* der Pflanze WI10E16-12 gezeigt. Für die Amplikon-Tiefensequenzierung wurden in diesem Fall zwei Primerpaare verwendet, um die Zielmotive auf allen 3 Genomen abzudecken. Bei der Pflanze WI10E16 wurden im D- und A-Genom Mutationen detektiert. Im D-Genom gab es eine Sequenzvariante, die durch eine hohe Anzahl an *Reads* (133) repräsentiert war und in der Mutationen in allen Zielmotiven auftraten. In einer weiteren Sequenzvariante mit einer vergleichbaren Anzahl an *Reads* (141) waren hingegen nur Mutationen in den Zielmotiven 11 und 12 enthalten. Insgesamt zeigten 83 % der *Reads* im D-Genom Mutationen. Im B-Genom konnte nur die gRNA12 binden und 69 % der *Reads* zeigten Mutationen im Zielmotiv 12. Die häufigste Mutation in diesem Zielmotiv war eine 2 bp-Deletion.

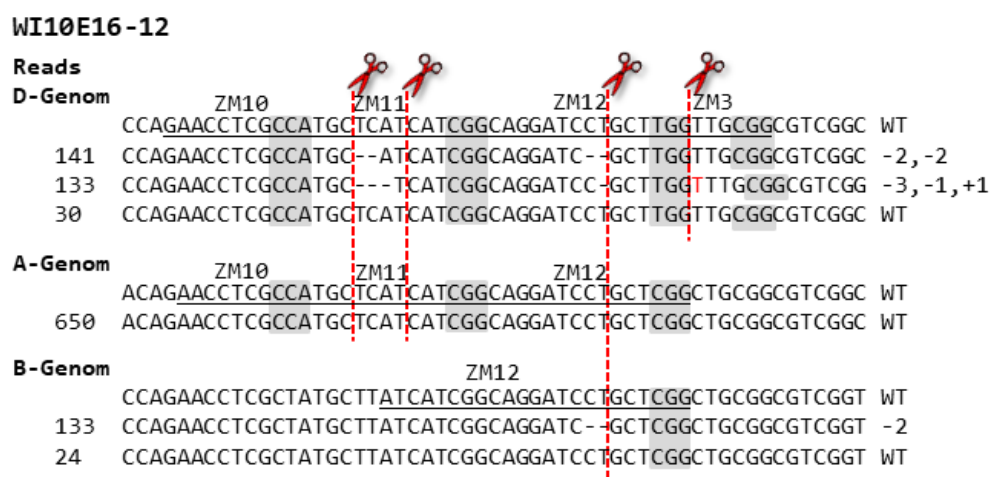


Abbildung 31: Ergebnisse der Amplikon-Tiefensequenzierung von Zielregionen der Pflanze WI10E16-12 Es werden jeweils die ein bis drei Sequenzvarianten mit den meisten *Reads* angezeigt. Die Zahl auf der linken Seite gibt die Anzahl der *Reads* einer Sequenz an. Auf der rechten Seite der Sequenz steht jeweils die Art der Mutation (WT: Wildtyp; -1: Anzahl deletierter Basen; +1: Anzahl eingefügter Basen). Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt

Insgesamt waren im Vergleich mit den Nachkommen der WI8-Pflanzen weniger Nachkommen der Pflanzen WI10E16 und WI10E40 mutiert und die durchschnittlichen Mutationsraten lagen bei 15 % und 36 %. Die Primärmutante WI10E40 hatte einen vergleichsweise hohen Anteil an *Reads* mit mutierten Sequenzen (60 %), während WI10E16 nur einen Anteil von 5 % aufwies. Nur zwei Nachkommen von WI10E16 und fünf von WI10E40 hatten einen Anteil an *Reads* mit mutierten Sequenzen von über 50 %. Eine Ursache für die vergleichsweise geringen Mutationsraten kann sein, dass die in dem Konstrukt 2 verwendeten gRNAs weniger effizient waren oder es durch die Nähe der Zielmotive zueinander zu Beeinträchtigung bei der Bindung des gRNA/Cas9-Komplexes an das Zielmotiv gekommen ist. In Abbildung 32 werden beispielhaft ein weiteres Nachkomme der Pflanze WI10E16 und drei der Pflanze WI10E40 gezeigt. Im D-Genom zeigten einige Pflanzen eine 3 bp-Deletion in den Zielmotiven 10 und 11, eine 1 bp-Deletion im Zielmotiv 12 und eine 1 bp-Insertion im Zielmotiv 3. Alle Pflanzen mit Mutationen in den A- und B-Genomen hatten eine 15 bp-Deletion im Zielmotiv 11 bzw. eine 2 bp-Deletion im Zielmotiv 12.

						Anteil der mutierten Reads
D-Genom		ZM10	ZM11	ZM12	ZM3	
	CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	WT				
WI10E16-20	CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	WT				
WI10E40-1	CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	-3, -1, +1				34 %
WI10E40-3	CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	-2, -2				68 %
WI10E40-17	CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	-3, -1, +1				83 %
A-Genom		ZM10	ZM11	ZM12		
	ACAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	WT				
WI10E16-20	ACAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	WT				0 %
WI10E40-1	ACAGAACC-----TTCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	-15				17 %
WI10E40-3	ACAGAACC-----TTCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	-15				41 %
WI10E40-17	ACAGAACC-----TTCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	-15				64 %
B-Genom				ZM12		
	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	WT				
WI10E16-20	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	-2				33 %
WI10E40-1	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	-2				24 %
WI10E40-3	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	-2				58 %
WI10E40-17	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	-2				69 %

Abbildung 32: Repräsentative Ergebnisse der Amplikon-Tiefensequenzierung von Zielregionen der WI10 T1-Pflanzen Es wird jeweils die Sequenzvariante mit den meisten mutierten *Reads* angezeigt. Auf der rechten Seite der Sequenz steht jeweils die Art der Mutation (WT: Wildtyp; -1: Anzahl deletierter Basen; +1: Anzahl eingefügter Basen) und daneben der Anteil der gesamten *Reads* mit Mutationen an dem gesamten Anteil der Sequenzier-*Reads*. Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt.

Repräsentativ für die Sanger-Sequenzierung der drei WI10E16- und sieben WI10E40-Nachkommen werden in Tabelle 19 die Ergebnisse der Pflanzen WI10E16-12 und WI10E40-1 gezeigt. Obwohl für WI10E16-12 in der Amplikon-Tiefensequenzierung

relativ hohe Mutationsraten detektiert wurden, wurde in der Sanger-Sequenzierung auf allen drei Genomen nur das jeweilige *Lr67*-Wildtyp-Allel nachgewiesen. Ebenso konnten in der Sanger-Sequenzierung bei weiteren WI10E16-Nachkommen nur die Wildtyp-Allele detektiert werden. Die WI10E16-Nachkommen hatten, wie bereits weiter oben erwähnt, laut Amplikon-Tiefensequenzierung nur eine Mutationsrate von durchschnittlich 15 %, was offenbar unter dem Detektionslimit der Sanger-Sequenzierung liegt. Interessanterweise wurde bei drei WI10E40-Nachkommen im B-Genom im Zielmotiv 12 eine 74 bp-Insertion gefunden, die vom Transformationsvektor pIK139 stammte.

Tabelle 19: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der Zielregionen von WI10E16-12 und WI10E40-1

Pflanze	Mutationen im Zielmotiv	Mutationen im Zielmotiv	Mutationen im
	10/11/12/3	10/11/12/3	Zielmotiv 10/11/12/3
	D	B	A
WI10E16-12	WT/WT/WT/WT	WT/WT/WT/WT	WT/WT/WT/WT
WI10E40-1	-2/WT/-2/WT	WT/WT/+74/WT	n.d.

WT: Wildtyp; n.d.: nicht definiert, Sequenzierung war nicht erfolgreich

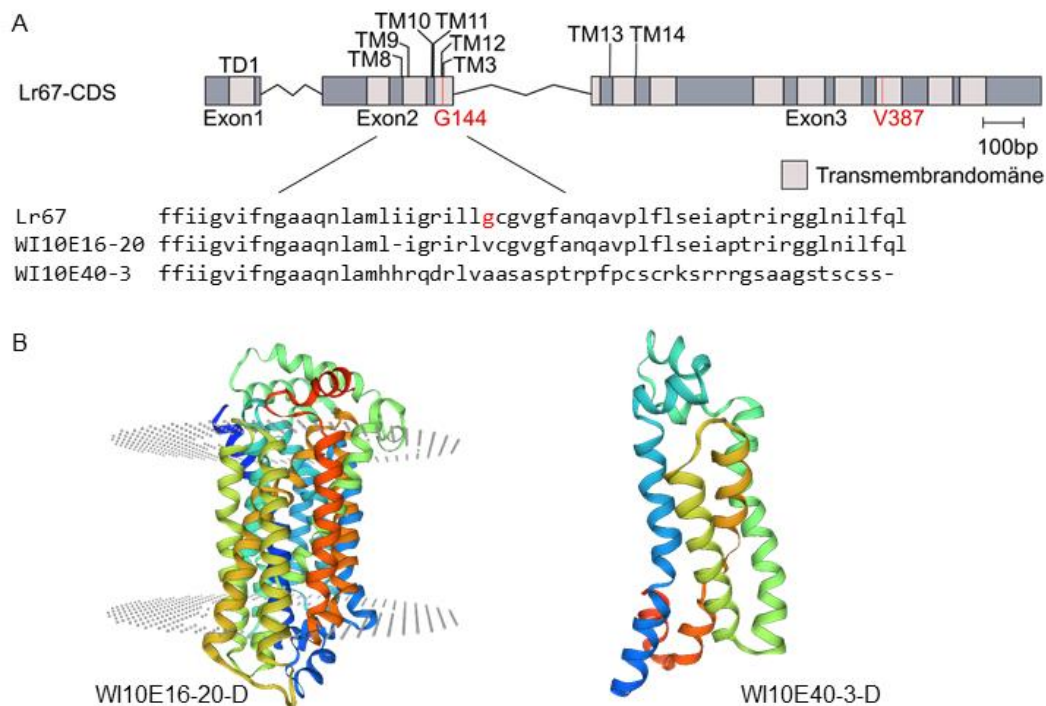


Abbildung 33: Modellierung der Proteinstruktur von Lr67 in den WI10-T₁-Nachkommen (A) Im Bereich der Zielregionen werden die Proteinsequenzen ausgewählter Mutanten dargestellt. (B) Die Proteinstrukturen wurden mit dem ExPasy *Tool* erstellt. <https://swissmodel.expasy.org/>

Für zwei der WI10-Nachkommen wurden beispielhaft die Lr-D67-Proteinstrukturen vorhergesagt (Abbildung 33). Die Mutationen der Pflanze WI10E16-20 führten zum Verlust einer Aminosäure und dem Austausch von zwei Aminosäuren, L142R und G144V. Die Proteinstruktur war ähnlich wie die von dem Lr67-Wildtypprotein. Die Mutationen

der Pflanze WI10E40-3 führten zu einer Verschiebung des Leserahmens in der vierten Transmembrandomäne, wodurch es ab der Position 136 zu 39 veränderten Aminosäuren kam und in einem frühen Stopcodon an Position 174 resultierte. Dadurch war das Protein um 341 Aminosäuren verkürzt.

Da die Transformation mit dem Konstrukt 2 zunächst nur wenige Mutanten hervorbrachte, wurde es noch für drei weitere Agrobakterien-vermittelte Transformationen von ‚Bobwhite‘ (WI13 und WI14) und ‚Taifun‘ (WI15) verwendet. Bei den Experimenten WI13 und WI15 wurde in der Regeneration ein Selektionsdruck von 0, 20, 30 mg Hygromycin in den Kallus-Induktionsmedien verwendet, was im Vergleich mit WI14 zu einer geringeren Anzahl an regenerierten Pflanzen führte. Jedoch waren bei diesen Experimenten auch zwei von drei Pflanzen bzw. drei von vier Pflanzen mutiert (Tabelle 20).

In dem Experiment WI14 wurde nur anfänglich ein Selektionsdruck (s. Kapitel 2.2.20.2.) verwendet, wodurch über 500 Pflanzen regenerierten. Von diesen wurden 192 Pflanzen stichprobenartig mittels Amplikon-Tiefensequenzierung analysiert und in vier Pflanzen konnten Mutationen nachgewiesen werden. Jedoch lag der durchschnittliche Anteil mutierter *Reads* der vier mutierten Pflanzen bei 1,7 %. Dies wurde eher als Hintergrundrauschen aufgrund von Amplifikations- und Sequenzierfehlern interpretiert, weshalb die Ergebnisse nicht dargestellt werden.

Für die Experimente WI16 bis WI19 wurden die Lr67-Konstrukte 3 und 4 verwendet (Abbildung 35). Diese enthielten neben der Endonuklease-Expressions-kassette nur die Lr67-gRNA3 oder die gRNA3-1, welche eine Variante der Lr67-gRNA3 ist, bei der das erste Nukleotid entfernt wurde, um zu testen, welche Variante effizienter ist (Abbildung 26B). Die gRNA3 fängt mit zwei Guanin-Nukleotiden an, während die gRNA3-1 auf 19 Nukleotide verkürzt wurde und mit nur einem Guanin-Nukleotid anfängt. Ein U6-Promotor benötigt als Transkriptionsstart ein Guanin und theoretisch würde ein zweites Guanin-Nukleotid am Anfang der gRNA für einen alternativen Transkriptionsstart sorgen, falls das erste Guanin überlesen wird. Ausgehend von dieser Annahme ist zu erwarten, dass durch das Vorhandensein von zwei Guanin-Nukleotiden als Transkriptionsstart mehr Transkripte, also gRNAs gebildet werden und somit womöglich eine höhere Effizienz zu erwarten ist.

Die Experimente WI17 und WI19 wurden mit dem gleichen Selektionsdruck wie für WI14 durchgeführt und pro Experiment wurden über 400 Pflanzen regeneriert. Jedoch wurden in diesem Fall keine Mutanten detektiert. Die Experimente WI16 und WI18 wurden mit

dem Standard-Selektionsdruck (0, 20, 50 mg Hygromycin in den Kallus-Induktionsmedien) durchgeführt und 28 bzw. 29 Pflanzen wurden regeneriert. Unter diesen regenerierten Pflanzen wurden je sechs bzw. vier Mutanten detektiert.

Tabelle 20: Übersicht der Experimente WI13 - WI19

Experiment	Genotyp	Methode	Konstrukt	Analysierte T0 Pflanzen	hpt ⁺	Mutanten
WI13	Bobwhite	Agrobakterien	2	3	2	2
WI14	Bobwhite	Agrobakterien	2	192	20	0
WI15	Taifun	Agrobakterien	2	4	1	3
WI16	Bobwhite	Agrobakterien	3	28	1	6
WI17	Bobwhite	Agrobakterien	3	95	3	0
WI18	Bobwhite	Agrobakterien	4	29	0	4
WI19	Bobwhite	Agrobakterien	4	95	7	0

					Anteil der mutierten Reads
D-Genom					
	ZM10	ZM11	ZM12	ZM3	
	CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGCGTCGGC	WT			
WI13E02	CCAGAACCTCGCCATGC--ATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGCGTCGG	-2,+1	18 %		
WI13E03	CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTT-GTTGCGGCGTCGGC	-1	21 %		
WI15E01	CCAGAACCTCGCCATGGTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGCGTCGG	+1	6 %		
WI15E02	CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCC---TGG--GCGGCGTCGGC	-4,-2	2 %		
WI15E04	CCAGAACCTCGCCATGCT--TCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGCGTCGGC	-2	14 %		
B-Genom					
		ZM12			
	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGCGTCGGT	WT			
WI13E02	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATC--GCTCGGCTGCGGCGTCGGT	-2	13 %		
WI13E03	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCC-GCTCGGCTGCGGCGTCGGT	-1	5 %		
WI15E01	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGCGTCGGT	WT	0 %		
WI15E02	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGCGTCGGT	WT	0 %		
WI15E04	CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGCGTCGGT	WT	0 %		

Abbildung 34: Repräsentative Ergebnisse der Amplikon-Tiefensequenzierung der regenerierten Pflanzen der Experimente WI13 und WI15. Es wird jeweils die Sequenzvariante mit den meisten mutierten Reads angezeigt. Auf der rechten Seite der Sequenz steht jeweils die Art der Mutation (WT: Wildtyp; -1: Anzahl deletierter Basen; +1: Anzahl eingefügter Basen) und daneben der Anteil der gesamten Reads mit Mutationen an dem gesamten Anteil der Sequenzier-Reads. Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt.

Die Ergebnisse der Amplikon-Tiefensequenzierung der Experimente WI13 und WI15 sind in Abbildung 34 dargestellt. Insgesamt war der Anteil der Reads mit mutierter Sequenz bei diesen Pflanzen geringer als bei den vorherigen Experimenten. Die regenerierten Pflanzen WI13E02 und WI13E03 hatten mit 18 % bzw. 21 % den höchsten Anteil an Reads mit mutierter Sequenz.

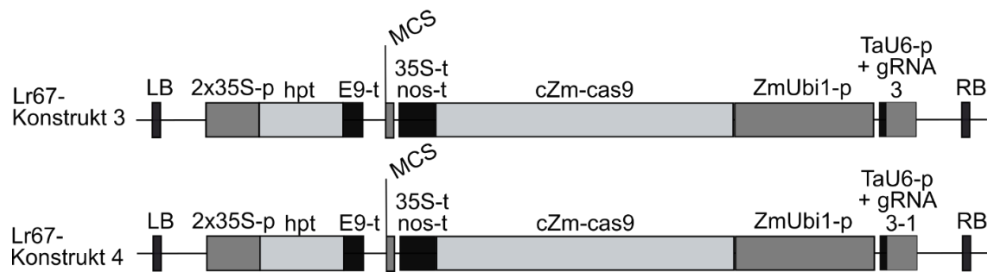


Abbildung 35: Lr67-Einzelkonstrukte Grafische Darstellung der verwendeten Binärvektoren für die zielgerichtete Mutagenese des Zielmotivs 3.

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Amplikon-Tiefensequenzierung der Experimente WI16 und WI18 dargestellt. Für das Experiment WI16 wurde nur die Lr67-gRNA3 verwendet. Insgesamt war der durchschnittliche Anteil an *Reads* mit mutierter Sequenz mit 3,6 % sehr gering für das Experiment WI16. Die Pflanze WI16E05 hatte mit einem Anteil von 15 % die meisten *Reads* mit mutierter Sequenz. Sie hatte im D-Genom eine 1 bp-Insertion und im B-Genom wurde ausschließlich die Wildtyp-Sequenz detektiert. Genauso verhielt es sich bei dem Experiment WI18, für das die Lr67-gRNA3-1 verwendet wurde. Auch bei diesen regenerierten Pflanzen war der durchschnittliche Anteil an *Reads* mit mutierter Sequenz mit 2,3 % sehr gering.

Die entstandene 1 bp-Deletion in WI16E01, WI16E19, WI16E22, WI18E03 und WI18E19 würde zu einem Knock-out von *Lr-D67* führen. Die anderen beiden Mutationen würden zu einer veränderten Aminosäuresequenz ab G144 führen, aber es entsteht kein frühzeitiges Stopcodon. Aufgrund der geringen Anteile an *Reads* mit mutierten Sequenzen ist es fraglich ob diese Pflanzen chimär sind oder es sich um Amplifikations- und Sequenzierfehler handelt. Auf die Analysen der Nachkommenschaften wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet.

				Anteil der mutierten Reads	
D-Genom		<u>CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC</u> CGTCGGC	WT		
WI16E01		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	-1	1 %	
WI16E02		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTT--GGCGTCGGC	-2	2 %	
WI16E05		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	+1	15 %	
WI16E19		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	-1	4 %	
WI16E21		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	+1	2 %	
WI16E22		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTGC	-1	2 %	
B-Genom		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	
WI16E01		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %
WI16E02		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %
WI16E05		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %
WI16E19		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %
WI16E21		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %
WI16E22		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %
D-Genom		<u>CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC</u> CGTCGGC	WT		
WI18E02		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	+1	1 %	
WI18E03		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	-1	2 %	
WI18E05		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	+1	3 %	
WI18E19		CCAGAACCTCGCCATGCTCATCATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	-1	3 %	
B-Genom		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	
WI18E02		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %
WI18E03		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %
WI18E05		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %
WI18E19		CCAGAACCTCGCTATGCTTATCATCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGCGGC	CGTCGGT	WT	0 %

Abbildung 36: Repräsentative Ergebnisse der Amplikon-Tiefensequenzierung der Zielregionen von WI16 und WI18 Es wird jeweils die Sequenzvariante mit den meisten mutierten *Reads* angezeigt. Auf der rechten Seite der Sequenz steht jeweils die Art der Mutation (WT: Wildtyp; -1: Anzahl deletierter Basen; +1: Anzahl eingefügter Basen) und daneben der Anteil der gesamten *Reads* mit Mutationen an dem gesamten Anteil der Sequenzier-*Reads*. Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt.

Insgesamt konnten verschiedene Primärmutanten für *Lr67* generiert werden, bei denen die Mutationen auch vererbbar waren. Mit dem CasCADE-System konnten Vektoren generiert werden mit denen es möglich war, bis zu vier Zielmotive gleichzeitig zu verändern. Dies führte zu unterschiedlichen Mutationsmustern in den drei Genomen mit der Folge, dass bei einigen Pflanzen mindestens ein *Lr67*-Homeoallel durch Leserahmenverschiebung ausgeschaltet wurde oder die Proteinsequenz soweit verändert wurde, dass dies auch deutliche Auswirkungen auf die Proteinstruktur hatte. Sobald durch Selbstung homozygote Mutanten verfügbar sein werden, soll anhand von Resistenztests geklärt werden, ob die entstandenen Mutationen Auswirkungen auf die Anfälligkeit des jeweiligen Weizen-Genotyps gegenüber Rostpilzen haben.

3.3. Das *Lr67*-Ortholog der Gerste

In den Publikationen von Moore et al. (2015) und Milne et al. (2019) wurde gezeigt, dass die Expression eines *Lr67res*-Transgens aus Weizen auch in Gerste zu einer partiellen Resistenz gegen verschiedene Rostarten und Mehltau führt. Ein Vergleich der publizierten *Lr67*-Sequenz (Moore et al., 2015) mit der zu dieser Zeit verfügbaren ‚Golden Promise‘-Referenzsequenz mit dem IPK Galaxy-*Tool* (<https://galaxy-web.ipk-gatersleben.de/>) hat gezeigt, dass die codierenden Sequenzen (3 Exons) von *Lr67* und *HORVU4Hr1G067450* zu 96 % identisch sind. Die Proteinsequenzen von *Lr67* und dem Gerstengen *HORVU4Hr1G067450* auf dem Chromosom 4H sind zu 98,8 % identisch. Es handelt sich bei dem Gen um *HvStp13*, das ebenfalls ein funktionaler Zuckertransporter ist. Ein *Screening* von 267 Gersten Akzessionen zeigte, dass keine Akzession den G144R oder V387L verursachenden SNP trägt (Milne et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit sollte *HvStp13* mittels der gRNA-geleiteten Endonukleasen an verschiedenen Stellen mutiert werden, u.a. im Bereich des G144R verursachenden SNPs. Eine Auswahl der erzeugten Mutanten wurde auf mögliche Resistenzen gegen Braunrost getestet.

3.3.1. Gezielte Mutagenese von *Stp13* der Gerste

Es wurden acht verschiedene gRNAs ausgewählt und damit Zielmotive in allen drei Exons adressiert (Abbildung 37). Zum Teil wurden gRNAs verwendet, die ursprünglich für die Verwendung in Weizen ausgewählt wurden (*HvStp13*-gRNA1, gRNA2 [entspricht *Lr67*-gRNA8], gRNA6 [entspricht *Lr67*-gRNA13], gRNA7 und gRNA8). Diese gRNAs binden sowohl im Weizen als auch im *Stp13*-Gen der Gerste, jedoch fiel erst während der Arbeit auf, dass bei dem Zielmotiv 8 in Gerste das PAM nicht wie im Weizen TGG sondern TCG ist. Somit war nicht zu erwarten, dass der gRNA/Cas9-Komplex am Zielmotiv 8 binden und Doppelstrangbrüche induzieren würde. Mittels der modularen CasCADE-Vektoren wurden diese acht gRNAs mit einem Endonuklease-Vektor zu dem Konstrukt 1 (gRNA1, 6, 7 und 8) und Konstrukt 2 (gRNA2, 3, 4 und 5) für die Gerstentransformation assembliert.

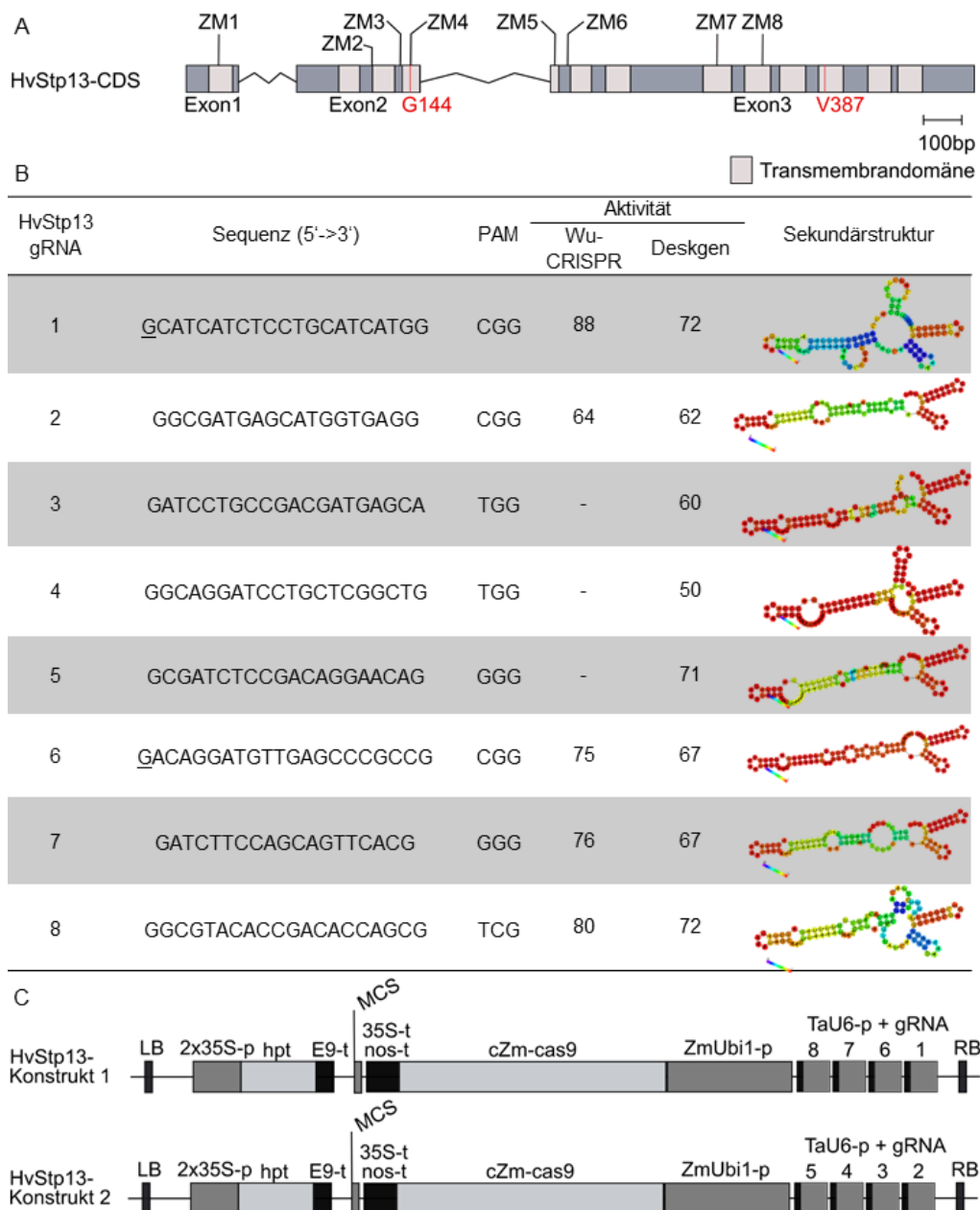


Abbildung 37: Auswahl der *HvStp13*-gRNAs (A) Grafische Darstellung der *HvStp13*-CDS mit den Zielmotiven. Die von *Lr67* bekannten G144R und V387L verursachenden SNPs sind eingezeichnet. (B) Auflistung der *HvStp13*-gRNAs, den vorhergesagten Effizienzen und der Sekundärstruktur (C) Die beiden *HvStp13*-Binärvektoren, die für die gezielte Mutagenese von mehreren Zielmotiven verwendet wurden.

Für das Experiment BG891 wurde das *HvStp13*-Konstrukt 1 verwendet und insgesamt konnten 50 Gerstenpflanzen regeneriert werden. Bei 49 Pflanzen ließ sich mittels PCR das *hpt*-Gen nachweisen und in der Sanger-Sequenzierung der Zielmotive konnten 42 Mutanten detektiert werden (Tabelle 21). Bereits 15 der 42 mutierten T₀-Pflanzen waren homozygot für ihre jeweilige Mutation. Das *HvStp13*-Konstrukt 2 wurde für das Transformationsexperiment BG897 verwendet. Hier konnten 33 Pflanzen regeneriert werden, von denen 31 PCR-positiv für das *hpt*-Transgen waren. 24 der 33 Pflanzen waren mutiert, davon waren sieben Pflanzen bereits homozygot.

Tabelle 21: Mutationseffizienz der HvStp13-Konstrukte 1 und 2

Experiment	Konstrukt	Regenerierte Pflanzen	hpt ⁺	Mutanten	Effizienz [%]
BG891	1	50	49	42	84
BG897	2	33	31	24	73

Beispielhaft werden einige Sequenzen von Pflanzen gezeigt, die anschließend für weitere Experimente verwendet wurden (Abbildung 38). Für das Experiment BG891 werden die Zielmotive 6 und 7 gezeigt. Wie eingangs bereits erwähnt, ist das PAM des Zielmotivs 8 der Gerste ein TCG und es wurden dem entsprechend auch keine Pflanzen mit Mutationen in diesem Zielmotiv gefunden. Die Mehrheit homozygot mutierter BG891-Pflanzen wiesen in Zielmotiv 6 entweder eine 1 bp-Insertion oder eine 1 bp-Deletion auf. Die häufigste Mutation in Zielmotiv 7 war eine 1 bp-Insertion.

Für das Experiment BG897 werden Ergebnisse für die Zielmotive 2, 3 und 4 gezeigt (Abbildung 38B). Einige der homozygot mutierten Pflanzen hatten große Deletionen, bei denen genau die Sequenzen zwischen den Zielmotiven 2 und 4 oder zwischen den Zielmotiven 2 und 3 entfernt wurden. Nur wenige Pflanzen hatten einzelne kleinere Mutationen in den jeweiligen Zielmotiven (z.B. BG897E01, BG897E21).



Abbildung 38: Auswahl an Sequenzen von HvStp13-Zielregionen in Primärmutanten (A) Für die BG891 T₀-Pflanzen werden die Zielmotive 6 und 7 gezeigt. (B) Für die BG897-Pflanzen werden die Zielmotive 2, 3 und 4 gezeigt. Auf der rechten Seite der Sequenz steht jeweils die Art der Mutation (WT: Wildtyp; -1: Anzahl deletierter Basen; +1: Anzahl eingefügter Basen). Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt.

Nach Selbstung wurde die Nachkommenschaft der in Tabelle 22 aufgezählten Primärmutanten untersucht. Zunächst wurden je 20 Körner ausgelegt und genomische DNA der jungen Keimlinge ca. drei Wochen nach der Keimung extrahiert. Auffällig war, dass einige Nachkommen der Pflanzen BG897E04, BG897E14 und BG897E15 im Vergleich mit den anderen sehr klein und in der Entwicklung zurückgeblieben waren. So waren zum Beispiel aus den 20 ausgelegten Körnern der Pflanze BG897E04, die bereits in der T₀-Generation eine homozygote 99 bp-Deletion zwischen dem Zielmotiv 2 und 4

aufwies und nicht transgenfrei war, nur zwei Pflanzen gekeimt und beide entwickelten sich deutlich langsamer als die Nachkommen der anderen Primärmutanten. Die Nachkommenschaft der Pflanzen BG897E14 und BG897E15, die beide in der T₀-Generation noch heterozygot waren, verhielten sich vergleichbar. Aus den 20 ausgelegten Körnern waren nur je zehn Pflanzen gewachsen und diese waren im Vergleich mit den Nachkommen der anderen Primärmutanten größtenteils sehr klein.

Zunächst wurde die T₁-Generation auf das Vorhandensein des Transgens überprüft. Dafür wurde mittels PCR mit spezifischen Primern das *hpt*-Gen amplifiziert. Daraufhin wurden je fünf möglichst transgenfreie Pflanzen (zwei für BG897E04) für die Sanger-Sequenzierung ausgewählt.

Tabelle 22: Übersicht der analysierten HvStp13-T₁-Pflanzen

Pflanzen	Konstrukt	T ₁ -Pflanzen	hpt ⁺	Sequenzierte Pflanzen	Mutanten
BG891E01	1	20	12	5	5
BG891E04	1	20	17	5	5
BG897E01	2	17	16	5	5
BG897E04	2	2	1	2	2
BG897E06	2	20	12	5	5
BG897E08	2	17	15	5	5
BG897E14	2	10	0	5	5
BG897E15	2	10	6	5	5
BG897E20	2	18	15	5	4
BG897E21	2	19	14	5	3
BG897E30	2	17	11	5	4
BG897E33	2	19	2	5	4

Ein Großteil der sequenzierten Pflanzen war mutiert und größtenteils konnten die Mutationsmuster aus der T₀-Generation wiedergefunden werden. Beispielhaft wird für jede Nachkommenschaft eine Pflanze gezeigt, die die häufigste Mutationsvariante repräsentiert (Tabelle 23). Die meisten der sequenzierten T₁-Pflanzen waren bereits homozygot und transgenfrei. Sowohl kleinere *Frameshift*-Mutationen (BG897E04_8) als auch große *In-frame*-Mutationen (BG897E30_3) wurden sequenziert.

Tabelle 23: Repräsentative Ergebnisse der HvStp13-T₁ Sanger-Sequenzierung

Pflanze	Mutationen im Zielmotiv 1/6/7	hpt ⁺	Phänotyp (Keimling)
BG891E01_3	+1/-1/+1	-	normal
BG891E04_16	-1/-1/+1	-	normal
GP	WT	-	normal
Mutationen im Zielmotiv 2/3/4/5			
BG897E01_1	-8/-4/+1/+1	+	normal
BG897E04_8	WT/+1/-1/+1	-	klein
BG897E06_6	WT/WT/-4/-6	-	normal
BG897E08_4	-99/-99/-99/+1	-	normal
BG897E14_2	-27/-2/+1/-7	-	klein
BG897E15_11	-99/-99/-99/ht	-	normal
BG897E20_9	+1,-4/-2/-12/+1	-	normal
BG897E21_12	-99/-99/-99/WT	-	normal
BG897E30_3	-114/-114/-114/-3	-	klein
BG897E33_10	-114/-114/-114/+1	-	normal
GP	WT	-	normal

WT: Wildtyp; ht: heterozygot bzw. chimär; GP: ‚Golden Promise‘

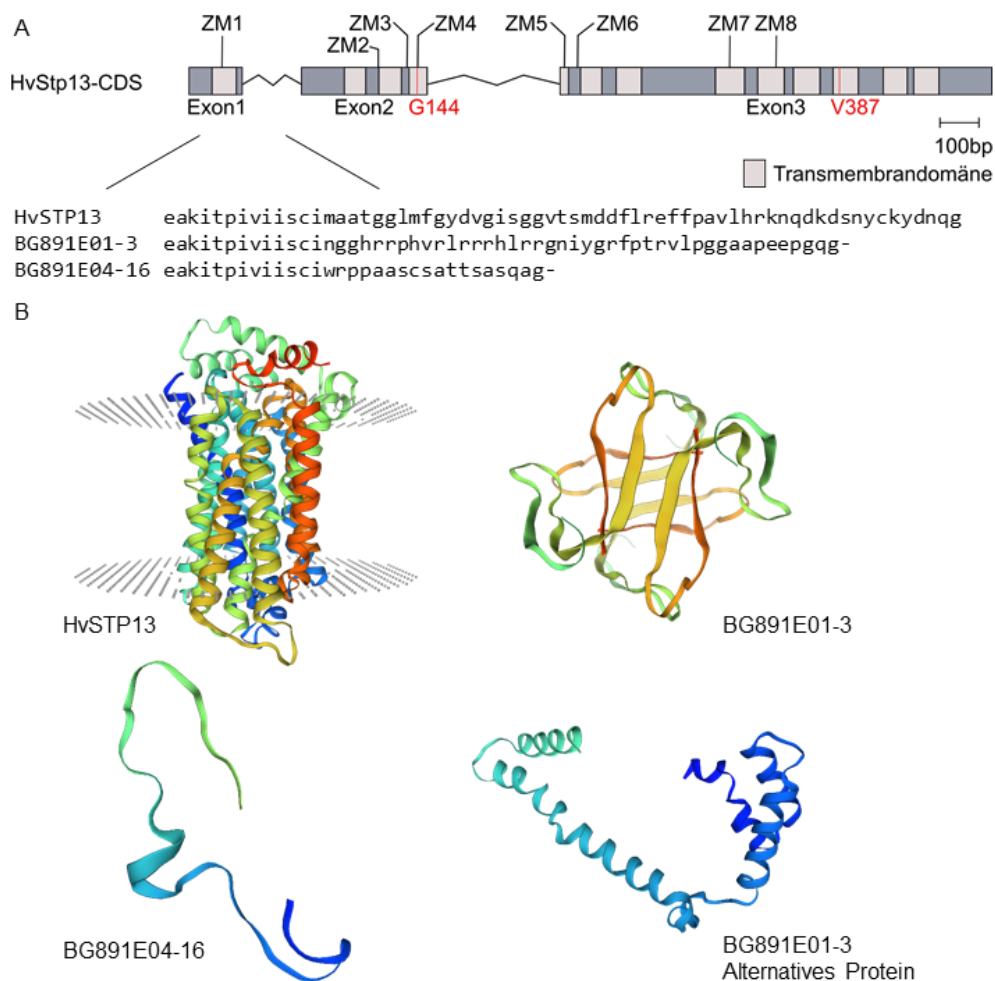


Abbildung 39: Modellierung der Proteinstrukturen von STP13 ausgewählter BG891-T₁-Mutanten (A) Im Bereich der Zielregionen werden die Proteinsequenzen ausgewählter Mutanten dargestellt. (B) Die Proteinstrukturen wurden mit dem Exspasy *Tool* erstellt. <https://swissmodel.expasy.org/>

Von ausgewählten *HvStp13-T₁*-Mutanten wurden die Proteinstrukturen mit dem ExPasy *Tool* modelliert. Das Zielmotiv der gRNA1 (Konstrukt 1, BG891) liegt in der codierenden Sequenz der ersten Transmembrandomäne im Exon 1. Im Zielmotiv 1 waren sowohl 1 bp-Insertionen als auch Deletionen entstanden, was in beiden Fällen zu einer Verschiebung des Leserasters bei der Translation und zu einem frühen Stopcodon an Position 71 (BG891E01-3) und 47 (BG891E04-16) führte (Abbildung 39). Dementsprechend sind die translatierten Aminosäuresequenzen von BG891E01-3 und BG891E04-16 verändert und um 444 bzw. 468 Aminosäuren verkürzt, was entsprechend in der Modellierung zu einem verkleinerten Protein ohne Transmembrandomänen führt. Sowohl für BG891E01-3 (Abbildung 39) als auch BG891E04-16 gibt es alternative Transkriptionsstarts, jedoch sind die dazugehörigen Proteine auch stark verkürzt und weisen deutliche Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auf.

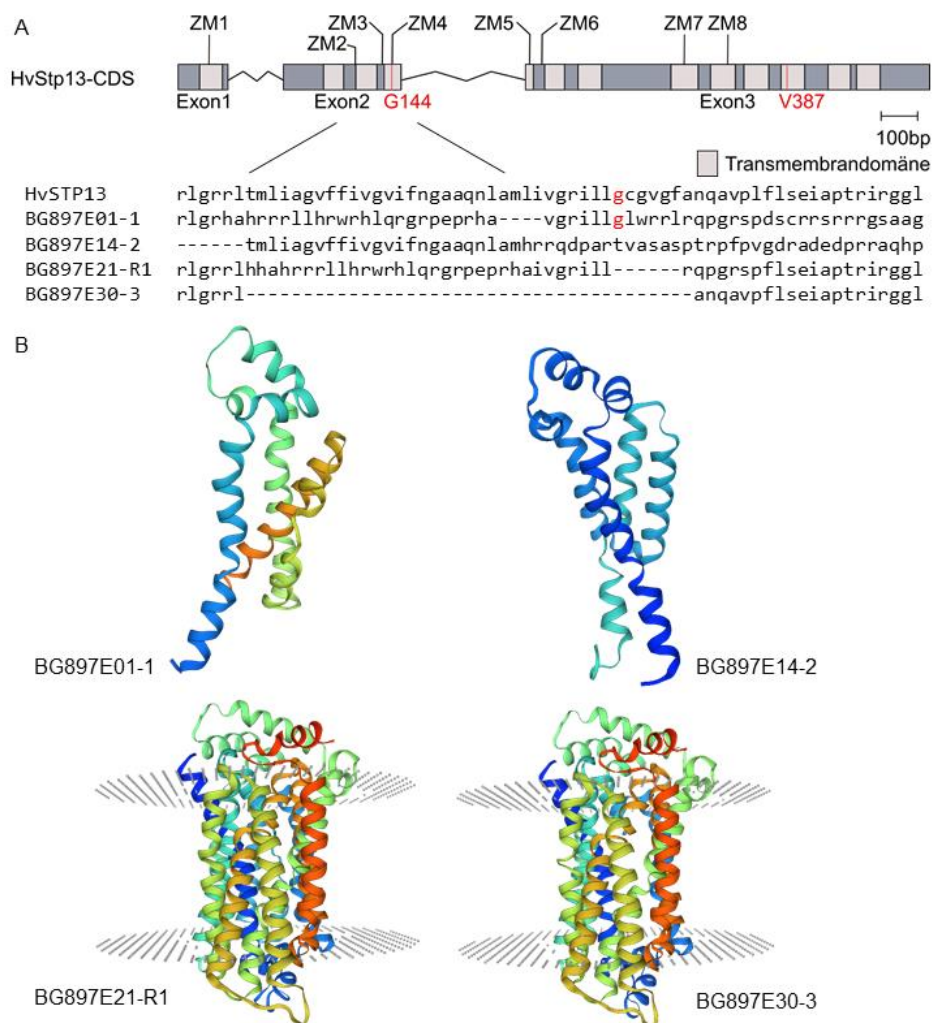


Abbildung 40: Modellierung der Proteinstrukturen für STP13 ausgewählter BG897-T₁-Mutanten (A) Im Bereich der Zielregionen werden die Proteinsequenzen ausgewählter Mutanten dargestellt. G144 ist in der Sequenz durch rote Schrift markiert. (B) Die Proteinstrukturen wurden mit dem ExPasy *Tool* erstellt. <https://swissmodel.expasy.org/>

Für das Transformationsexperiment BG897 wurde Konstrukt 2 verwendet, dessen gRNAs ihre Ziel motive ausschließlich in der dritten und vierten Transmembrandomäne haben. Die vier ausgewählten T₁-Pflanzen hatten unterschiedliche Mutationen in den Ziel motiven, die verschiedene Auswirkungen auf die Proteinsequenz hatten (Abbildung 40). Bei der Pflanze BG897E01-1 führte die im Zielmotiv 2 entstandene Mutation während der Translation zu einer Verschiebung des Leserahmens, der durch die Mutation im Zielmotiv 3 nach 84 Basen jedoch wieder in das ursprüngliche Raster zurückgesetzt wurde. Die 1 bp-Insertion im Zielmotiv 4 führte wiederum zu einer erneuten Verschiebung des Leserahmens, wodurch es zu 32 veränderten Aminosäuren und einem frühen Stopcodon an Position 172 kam. Dadurch war das Protein um 344 Aminosäuren verkürzt und in der Modellierung der Proteinstruktur waren nur vier Transmembrandomänen zu erkennen. Durch die Mutationen in der Pflanze BG897E14-2 kam es ebenfalls zu einer Verschiebung des Leserahmens, was zu einer veränderten Aminosäureabfolge ab der Position 136 aber nicht zu einem frühen Stopcodon führte. Die Proteinstruktur war jedoch stark verändert und es wurden nur zwei vollständige Transmembrandomänen gebildet. Durch die Mutationen in den Pflanzen BG897E21-R1 (+1/-1/-17/-1) und BG897E30-3 (-114/-114/-114/-3) kam es zum Verlust von einigen Aminosäuren in der zweiten und dritten Transmembrandomäne, u.a. auch von G144R. Die Gesamt-Proteinstruktur blieb dabei weitgehend erhalten, auch wenn eine (BG897E21-R1) bzw. zwei (BG897E30-3) Transmembrandomänen fehlten.

Für Gerste wurde ebenfalls ein Konstrukt mit nur einer gRNA (HvStp13-gRNA4) erstellt, um Pflanzen zu generieren, die nur Mutationen in der Nähe der Position G144 haben. Für das Experiment BIK995 wurden 16 Pflanzen regeneriert, wobei sich 13 Pflanzen als mutiert erwiesen (Tabelle 24).

Tabelle 24: Mutationseffizienz des HvStp13-Konstrukts 3

Experiment	Konstrukt	Regenerierte Pflanzen	<i>hpt</i> ⁺	Mutanten	Effizienz [%]
BIK995	3 (gRNA4)	16	14	13	81

Zehn der mutierten Pflanzen waren heterozygot und drei Pflanzen hatten bereits homozygote Mutationen im Zielmotiv 4. Beispielhaft werden in Abbildung 41 die Sequenzen von zwei homozygot mutierten Pflanzen gezeigt, die beide eine 1 bp-Insertion im Zielmotiv 4 haben. Diese Mutation führte zu einer veränderten Aminosäuresequenz ab der Position 145. Alle außer zwei nicht-mutierte Pflanzen waren PCR-positiv für das *hpt*-Transgen.

		ZM 4		
GP		CTCATCGTCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGTGGCGTTCGGCTT	WT	
BIK995/A E02		CTCATCGTCGGCAGGATCCTGCTCGGCTGTGGCGTTCGGCT	+1	
BIK995/A E05		CTCATCGTCGGCAGGATCCTGCTCGGACTGTGGCGTTCGGCT	+1	

Abbildung 41: Auswahl sequenzierter Zielregionen von BIK995-Primärmutanten Das Zielmotiv 4 ausgewählter BIK995 T₀-Pflanzen wird gezeigt. Auf der rechten Seite der Sequenz steht jeweils die Art der Mutation (WT: Wildtyp; -1: Anzahl deletierter Basen; +1: Anzahl eingefügter Basen). Die Scheren und die gestrichelten Linien markieren die Schnittstellen der Cas9. Das Zielmotiv (inkl. PAM) ist unterstrichen und das PAM ist grau unterlegt.

Vom Experiment BIK995 liegt das von der T₀-Generation geerntete Saatgut vor. Die Analyse der nächsten Generationen war jedoch nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

3.3.2. Resistenztests anhand der Entwicklung von *Puccinia hordei* im adulten Pflanzenstadium

Aus Weizen ist bekannt, dass das *Lr67res*-Allel eine partielle und dauerhafte Resistenz gegen alle Rostarten in adulten Pflanzen vermittelt. In Gerste wurde gezeigt, dass das *Lr67res*-Allel als Transgen ebenfalls eine Resistenz gegen Rostpilze sowohl im juvenilen als auch adulten Stadium der Pflanze vermittelt. Für einen ersten Test wurden fünf *HvStp13*-T₁-Pflanzen ausgewählt, die verschiedene Mutationsmuster aufwiesen. Um die Resistenz im adulten Pflanzenstadium zu testen, wurden jeweils vier Nachkommen pro Pflanze angezogen und 28 Tage nach der Keimung mit dem *Puccinia hordei*-Isolat I80 infiziert. Zwölf Tage nach der Infektion (*days post-inoculation*, dpi) wurden die Pflanzen bonitiert und Blattproben genommen, um genomische DNA zu extrahieren. Zusätzlich zur Kontrolle mit dem ‚Golden Promise‘-Wildtyp wurde als Positivkontrolle die Sorte ‚Großklapprige‘ (Gk) getestet, die anfällig für Braunrost ist. Einige Nachkommen der Primärmutanten schienen in diesem ersten Test eine Resistenz zu zeigen (Pflanzen BG891E01, BG897E01, BG897E21, BG897E33), wobei es bei den Nachkommen von BG897E01 und BG897E33 sowohl Unterschiede bei der Bonitur als auch bei der Sequenzierung gab (Tabelle 25). Die beiden Kontrollen ‚Golden Promise‘ und ‚Großklapprige‘ wurden in diesem Versuch als mäßig anfällig bzw. als anfällig bonitiert. Leider gab es bei diesem Experiment eine Kontamination mit Blattläusen, was die Entwicklung der Pflanzen und wahrscheinlich auch ihre Reaktion auf die Pilzsporen beeinflusst hat.

Tabelle 25: Erster Resistenztest mit *HvStp13*-Mutanten

Pflanze	Mutationen im Zielmotiv 1/6/7	hpt ⁺	Infektionstyp
BG891E01-R1	+1/ht/ht	+	0-2
BG891E01-R2	+1/ht/ht	+	0-2
BG891E01-R3	+1/ht/ht	-	0-2
Mutationen im Zielmotiv 2/3/4/5			
BG897E01-R1	-8/-4/+1/+1	-	2 ⁺
BG897E01-R2	-8/-4/+1/+1	+	2 ⁻
BG897E01-R3	n.d.	+	2 ⁻
BG897E21-R1	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁻
BG897E21-R2	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁻
BG897E21-R3	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁻
BG897E21-R4	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁻
BG897E30-R1	-114/-114/-114/-3	-	2 ⁺
BG897E30-R2	-114/-114/-114/-3	+	2 ⁺
BG897E30-R3	ht/ht/ht/-1	+	2 ⁺
BG897E33-R1	-99/-99/-99/WT	+	2 ⁺
BG897E33-R2	n.d./n.d./n.d./+1	-	1
BG897E33-R3	n.d./n.d./n.d./+1	-	0-2
BG897E33-R4	n.d./n.d./n.d./+1	-	2 ⁻
GP	WT	-	2 ⁺
Gk	WT	-	3

0-2: resistent, 1: resistent, 2⁻: mäßig resistent, 2⁺: mäßig anfällig, 3: anfällig; ht: heterozygot bzw. chimär; n.d.: nicht definiert/ Sequenzierung fehlgeschlagen; WT: Wildtyp; GP: ‚Golden Promise‘-Wildtyp; Gk: ‚Großklapprige‘-Wildtyp

Dieser Resistenztest wurde mit Pflanzen der gleichen Nachkommenschaften wiederholt. Zwölf Tage nach der Infektion wurden die Pflanzen bonitiert, Blattproben genommen und Fotos aufgenommen. Außerdem wurden histologische Tests durchgeführt. Dafür wurden fünf und zwölf Tage nach der Infektion Blattproben genommen und die chitinhaltenen Zellwände der Pilze mit *Calcofluor White* angefärbt. Mit Hilfe eines Stereomikroskops ließen sich die Haustorienmutterzellen und Uredosporen zählen. Bei der Bonitur wurde der resistente Phänotyp der Nachkommenschaft der Pflanzen BG897E21 und BG897E33 aus dem ersten Test bestätigt (Tabelle 26). Des Weiteren wurden die Nachkommen der Pflanze BG897E30 als mäßig resistent bonitiert. Während sich die Nachkommen der Pflanzen BG897E01 und BG891E01 im ersten Test noch als mäßig resistent erwiesen, konnte dies im zweiten Test nicht bestätigt werden. Die beiden Kontrollen ‚Golden Promise‘ und ‚Großklapprige‘ wurden in diesem Versuch als mäßig anfällig bonitiert.

Tabelle 26: Zweiter Resistenztest mit HvStp13-Mutanten

Pflanze	Mutationen im Zielmotiv 1/6/7	hpt ⁺	Infektions-typ	HMZ 5 dpi	HMZ 12 dpi	Uredosporen/Lager 12 dpi
BG891E01-R4	+1/-1/+1	+	2 ⁺	18,8	70	82,0
BG891E01-R5	+1/ht/ht	+	2 ⁺	21,8	57,6	74,0
BG891E01-R6	+1/ht/ht	+	2 ⁺	17,6	63,6	74,8
BG891E01-R7	+1/ht/ht	+	2 ⁺	15,6	76	101,2
Mutationen im Zielmotiv 2/3/4/5						
BG897E01-R4	-8/-4/+1/+1	+	2 ⁺	26,5	76,8	119,2
BG897E01-R5	-8/-4/+1/+1	+	2 ⁺	20,6	73,2	99,6
BG897E01-R6	-8/-4/+1/+1	+	2 ⁺	18,5	63,6	88,4
BG897E01-R7	ht/ht/ht/-3	+	2 ⁺	16,5	74,0	95,6
BG897E21-R5	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁻	16,1	74,4	103,6
BG897E21-R6	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁻	18,4	94,0	114,5
BG897E21-R7	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁻	13,9	80,8	91,6
BG897E30-R4	-114/-114/-114/-3	+	2 ⁻	2,5	76,4	100,8
BG897E30-R5	-114/-114/-114/-3	+	2 ⁻	12,3	65,6	64,8
BG897E30-R6	-114/-114/-114/-3	+	2 ⁻	9,6	83,2	104,8
BG897E30-R7	-114/-114/-114/-3	-	2 ⁺	11,3	62,7	73,3
BG897E33-R5	WT/WT/WT/+1	+	1	18,8	79,2	106,0
BG897E33-R6	WT	+	2 ⁻	21,0	73,6	104,8
BG897E33-R7	+1/-1/-17/+1	+	2 ⁻	12,5	77,6	116,4
BG897E33-R8	ht/ht/-17/+1	-	2 ⁻	19,6	73,2	90,0
Gk	WT	-	2 ⁺	20,4	84,5	145,1
GP	WT	-	2 ⁺	23,8	94,8	126,9

1: resistent, 2⁻: mäßig resistent, 2⁺: mäßig anfällig; ht: heterozygot bzw. chimär; WT: Wildtyp; GP: ‚Golden Promise‘-Wildtyp; Gk: ‚Großklapprige‘-Wildtyp; HMZ: Haustorienmutterzellen, dpi: *days post-inoculation*

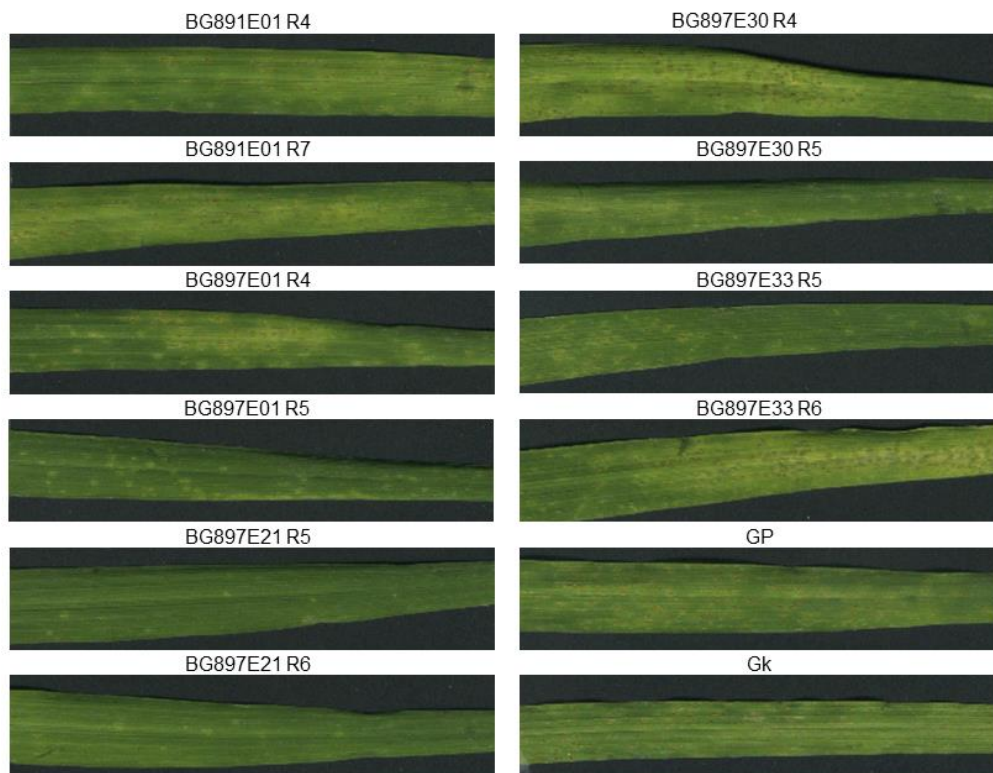


Abbildung 41: Entwicklung von Symptomen einer Rostinfektion auf den Blättern der im adulten Stadium infizierten *HvStp13*-T1-Mutanten 12 Tage nach der Infektion mit dem *Puccinia hordei*-Isolat I80. Das gesamte erste oder zweite Blatt einer Pflanze wurde eingescannt. GP: ‚Golden Promise‘; Gk: ‚Großklapprige‘

In den Abbildungen 41 und 42 sind jeweils zwei Blätter von infizierten Nachkommen einer Pflanze dargestellt. In den Übersichtsbildern ist zu erkennen, dass die phänotypischen Unterschiede der einzelnen Pflanzen nur gering sind. Lediglich auf den Blättern der Pflanzen BG897E21-R5 und BG897E21-R6 konnten nur wenige Uredosporenlager detektiert werden. Dies bestätigte sich auch anhand der Nahaufnahmen. Neben den Blättern der Pflanze BG897E21 wiesen auch die Blätter von BG891E01-R4, BG897E01-R5 und BG897E33-R5 deutlich weniger Uredosporenlager auf als die beiden Kontrollen ‚Golden Promise‘ und ‚Großklapprige‘.

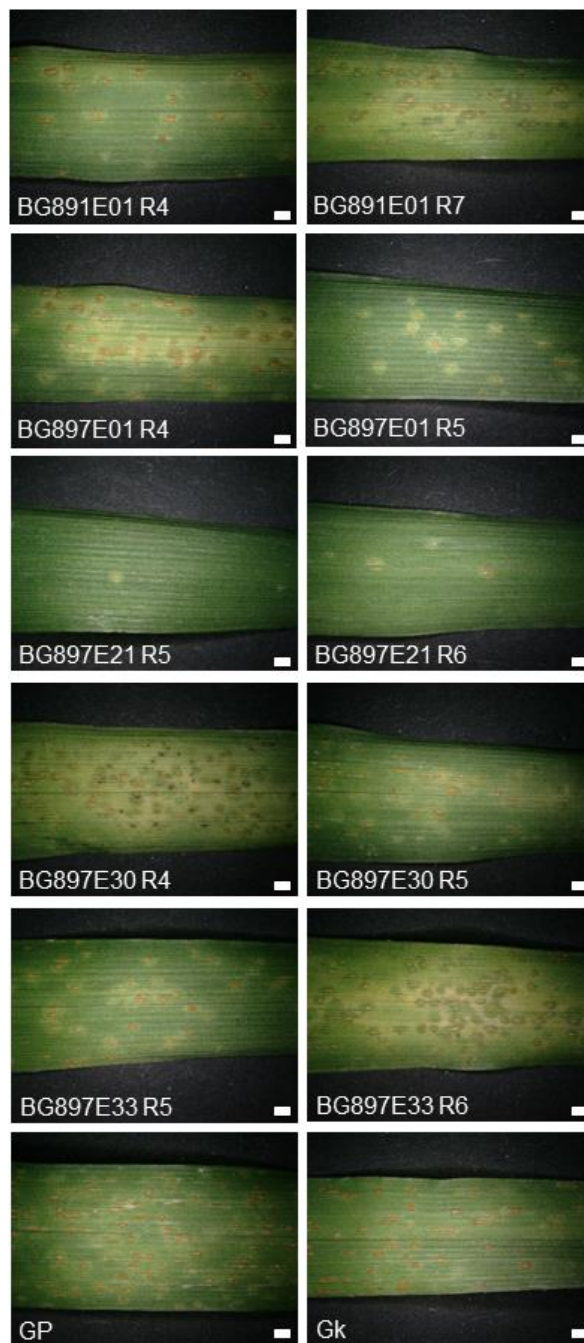


Abbildung 42: Nahaufnahmen der Rostpusteln von *HvStp13*-T₁-Mutanten (APR)
 Der weiße Balken entspricht einer Größe von 1.000 µm. GP: ‚Golden Promise‘; Gk: ‚Großklapprige‘

Für die Auswertung der Anzahl der Haustorienmutterzellen und der Uredosporen wurden die Pflanzen mit dem gleichen Genotyp innerhalb der Nachkommenschaft von einer Pflanze zusammengefasst. Beispielhaft sind in Abbildung 43 die Entwicklung einer Rostinfektion der Wildtyplinie ‚Golden Promise‘ und von zwei Mutanten dargestellt. Fünf Tage nach der Infektion mit Rostsporen war zu beobachten, wie der Pilz in den Pflanzen ein Netzwerk aus Haustorienmutterzellen bildet. Zwölf Tage nach der Infektion ließen sich zusätzlich zu den Haustorienmutterzellen auch die Uredosporen innerhalb eines Uredosporenlagers zählen.

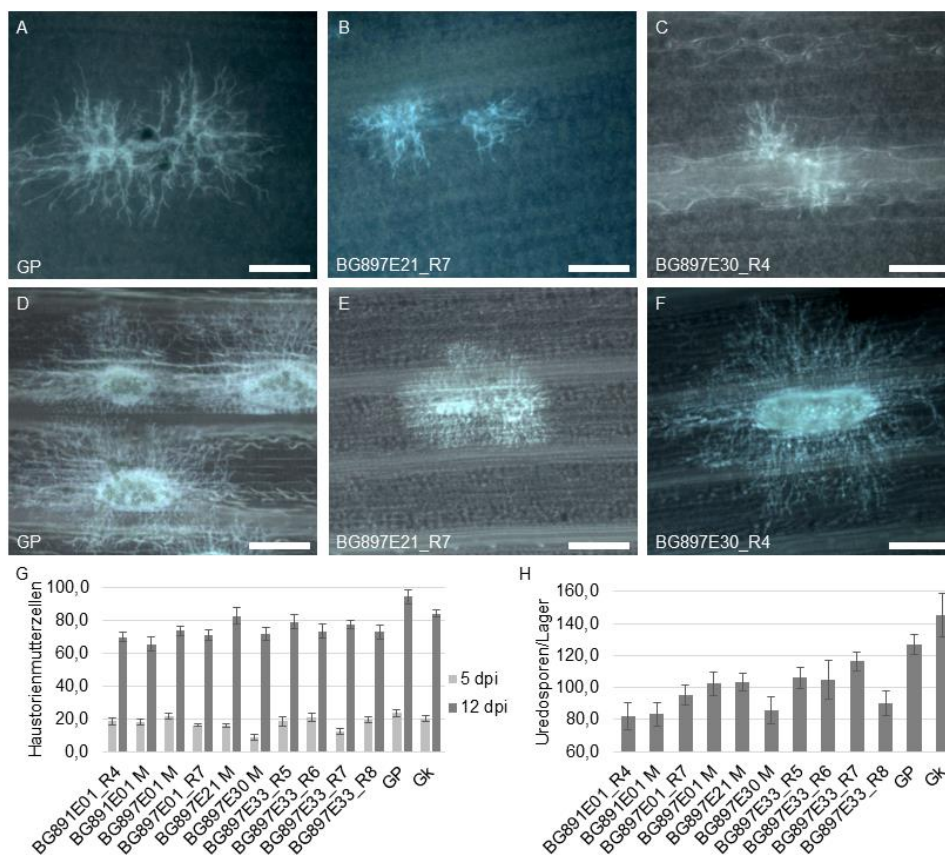


Abbildung 43: Entwicklung von mit *Calcofluor White*-angefärbten Pilzstrukturen nach der Infektion von adulten *HvStp13-T1*-Mutanten (A-C) Entwicklung der Haustorienmutterzellen fünf Tage nach der Infektion in ‚Golden Promise‘, BG897E21-R7 und BG897E30-R4. 20x Vergrößerung (D-F) Entwicklung der Haustorienmutterzellen und Uredosporen zwölf Tage nach der Infektion in ‚Golden Promise‘, BG897E21-R7 und BG897E30-R4. 10x Vergrößerung (G) Entwicklung der Haustorienmutterzellen fünf und zwölf Tage nach der Infektion. (H) Entwicklung der Uredosporen zwölf Tage nach der Infektion. Es wurden jeweils zehn Infektionsstellen von drei bis vier Blättern einer Linie ausgewertet. Der weiße Balken entspricht einer Größe von 1.000 µm. n=1, Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

Die Mutanten wiesen fünf und zwölf Tage nach der Infektion durchschnittlich weniger Haustorienmutterzellen und Uredosporen auf als der Wildtyp ‚Golden Promise‘. Insgesamt gesehen schienen die Nachkommen der Pflanze BG897E30 im Vergleich mit dem Wildtyp am wenigsten anfällig für die Rostinfektion zu sein. Jedoch wurde keine statistische Analyse erhoben, da es sich nur um eine Vorvalidierung in kleinerem Umfang

für eine erste Einschätzung handelte. Weitere Experimente mit ausreichend technischen Replikaten sind geplant, aber nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit.

3.3.3. Resistenztests anhand der Entwicklung von Braunrost im juvenilen Pflanzenstadium

Da gezeigt wurde, dass das *Lr67res*-Allel als Transgen in Gerste bereits im juvenilen Stadium eine Resistenz vermittelt, wurden in einem Versuch ausgewählte Pflanzen zehn Tage nach der Keimung mit dem *Puccinia hordei*-Isolat I80 inokuliert.

Tabelle 27: Resistenztest anhand juveniler *HvStp13*-Pflanzen

Pflanze	Mutationen im Zielmotiv 1/6/7	hpt ⁺	Infektions- typ	HMZ 5 dpi	HMZ 12 dpi	Uredosporen/ Lager 12 dpi
BG891E01-R8	+1/ht/ht	+	2 ⁻	12,7	106,0	122,4
BG891E01-R9	+1/inv 382	+	2 ⁻	6,2	91,6	133,2
BG891E01-R10	+1/inv 382	+	2 ⁻			
BG891E01-R11	+1/ht/ht	+	2 ⁻			
Mutationen im Zielmotiv 2/3/4/5						
BG897E01-R8	-8/-4/+1/+1	-	2 ⁺	14,0	93,2	138,0
BG897E01-R9	-8/-4/+1/+1	+	2 ⁺	14,9	74,4	152,8
BG897E01-R10	0/0/0/ht	+	2 ⁺			
BG897E21-R8	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁺	18,7	120,4	254,0
BG897E21-R9	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁺	18,3	139,2	196,0
BG897E21-R10	+1/-1/-17/-1	+	2 ⁺			
BG897E30-R8	-114/-114/-114/n.d.	+	2 ⁺	25,6	114,0	203,2
BG897E30-R9	-114/-114/-114/-3	+	2 ⁺	19,0	127,2	202,4
BG897E30-R10	-114/-114/-114/-3	+	2 ⁺			
BG897E30-R11	-114/-114/-114/-3	+	2 ⁺			
BG897E33-R9	0/0/0/+1	-	2 ⁺	12,9	96,0	227,6
BG897E33-R10	n.d./n.d./n.d./+1	-	2 ⁺	15,0	114,8	212,8
BG897E33-R11	0/0/0/n.d.	+	2 ⁺			
BG897E33-R12	0/0/0/+1	-	2 ⁺			
GP	WT	-	3	16,6	119,0	206,8
Gk	WT	-	3	26,0	115,6	182,7

2⁻: mäßig resistent, 2⁺: mäßig anfällig, 3: anfällig; ht: heterozygot bzw. chimär; n.d.: nicht definiert/Sequenzierung fehlgeschlagen; inv: invertiert; WT: Wildtyp; GP: ‚Golden Promise‘-Wildtyp; Gk: ‚Großklapprige‘-Wildtyp; HMZ: Haustorienmutterzellen, dpi: *days post-inoculation*

Die Nachkommen der Pflanze BG891E01 wurden bereits in diesem Stadium als mäßig resistent bonitiert. Alle anderen Pflanzen wurden als anfällig bonitiert. Da für diesen Versuch wieder die T₁-Generation verwendet wurde, waren noch nicht alle Nachkommen homozygot. So waren zum Beispiel innerhalb der Nachkommen der Pflanzen BG897E01 und BG897E33 die Genotypen nicht homozygot bzw. konnte nicht für alle Nachkommen von BG897E33 ein Sequenzierungsergebnis generiert werden (Tabelle 27). Innerhalb der

Nachkommen von BG897E01 hatten zwei Pflanzen Mutationen, die zu einer Verschiebung des Leserasters führten und eine Pflanze war heterozygot, aber aus dem Chromatogramm ging hervor, dass es sich um andere Mutationen handelt, als in den beiden homozygoten Geschwisterpflanzen. Auffällig war, dass zwei der BG891E01-Pflanzen (R9 und R10) zwischen den Zielmotiven 6 und 7 eine 382 bp große Inversion aufwiesen, die in vorherigen Sequenzierungen von Geschwisterpflanzen nicht detektiert wurden.

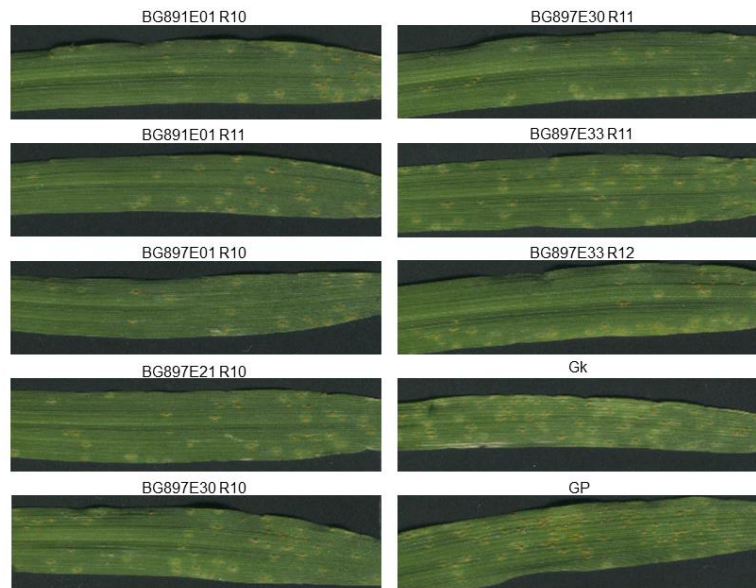


Abbildung 44: Entwicklung von Symptomen einer Rostinfektion auf den Blättern der im juvenilen Stadium infizierten *HvStp13-T1*-Mutanten 12 Tage nach der Infektion mit dem *Puccinia hordei*-Isolat I80. Das gesamte erste Blatt einer Pflanze wurde eingescannt. GP: ‚Golden Promise‘; Gk: ‚Großklapprige‘

In den Abbildungen 44 und 45 wird das erste Blatt von den im juvenilen Stadium infizierten Pflanzen gezeigt. Auf den Übersichtsbildern ist zu erkennen, dass die Blätter der *HvStp13*-Mutanten weniger Rostpusteln als die beiden Kontrollen ‚Golden Promise‘ und ‚Großklapprige‘ aufwiesen. Dies bestätigte sich auch in den Nahaufnahmen. Vor allem die Blätter der Nachkommen von BG891E01, BG897E01 und BG897E21 hatten weniger Rostpusteln als die Kontrollen. Dennoch wurden diese Pflanzen mit der Ausnahme von BG891E01 als mäßig anfällig bonitiert, da sie Pusteln in unterschiedlichen Größen hatten, die von nekrotischem Gewebe umgeben waren.

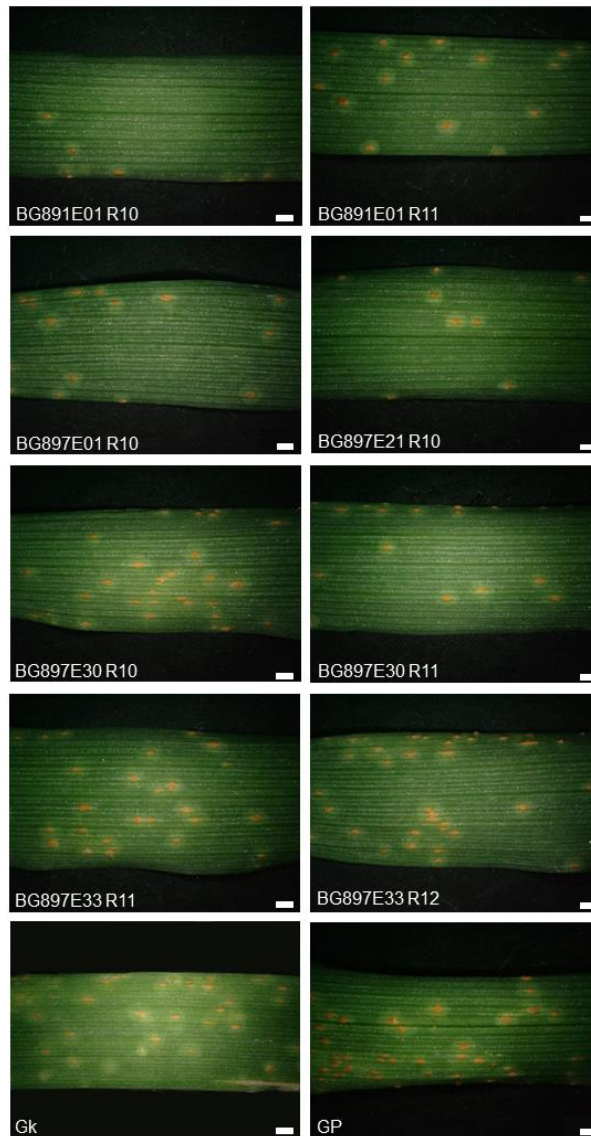


Abbildung 45: Nahaufnahmen der Rostpusteln von im juvenilen Stadium infizierten Pflanzen Der weiße Balken entspricht einer Größe von 1.000 µm. GP: ‚Golden Promise‘; Gk: ‚Großklappriige‘

In den histologischen Untersuchungen hat sich bestätigt, dass die Nachkommen von BG891E01 weniger Haustorienmutterzellen und Uredosporen im Vergleich mit den Kontrollen aufwiesen. Die anderen Pflanzen hatten eine mit den Kontrollen vergleichbare Anzahl an Haustorienmutterzellen und Uredosporen (Abbildung 46). Insgesamt schienen die Nachkommenschaften von drei Pflanzen im adulten Stadium und einer Pflanze bereits im juvenilen Stadium gegen Braunrost resistent zu sein. Diese Pflanzen hatten sowohl Leserastermutationen, die zu einem Knock-out führten (BG891), als auch *in-frame*-Mutationen, die zu dem Verlust von einer (BG897E21, BG897E33) bzw. zwei Transmembrandomänen (BG897E30) führten. Jedoch waren dies nur Vorversuche, um zu testen, ob die Pflanzen in der T₁-Generation schon geeignet für solche Tests sind und ob durch die unterschiedlichen Mutationen Resistenzen entstanden sind.

In Zukunft werden diese Experimente anhand von Nachkommenschaften homozygoter Linien in einem statistisch aussagekräftigen Umfang wiederholt. Dies ist ebenfalls mit den in dieser Arbeit hergestellten Weizenmutanten geplant.

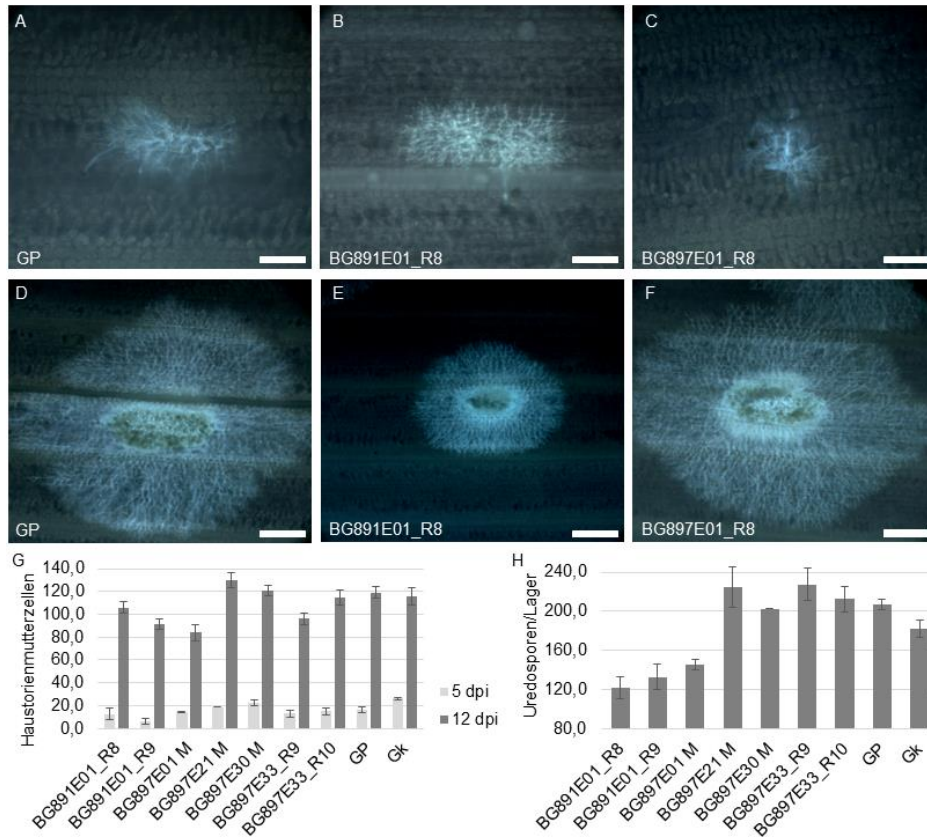


Abbildung 46: Entwicklung von mit *Calcofluor White*-angefärbten Pilzstrukturen nach der Infektion von juvenilen *HvStp13-T1*-Mutanten (A-C) Entwicklung der Haustorienmutterzellen fünf Tage nach der Infektion in ‚Golden Promise‘, BG891E01 R8 und BG897E01 R8. 20x Vergrößerung (D-F) Entwicklung der Haustorienmutterzellen und Uredosporen zwölf Tage nach der Infektion in ‚Golden Promise‘, BG891E01 R8 und BG897E01 R8. 10x Vergrößerung (G) Entwicklung der Haustorienmutterzellen fünf und zwölf Tage nach der Infektion. (H) Entwicklung der Uredosporen zwölf Tage nach der Infektion. Es wurden jeweils zehn Infektionsstellen von drei bis vier Blättern einer Linie ausgewertet. Der weiße Balken entspricht einer Größe von 1000 μm . $n=1$, Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde ein außerordentlich leistungsfähiges Vektorsystem für die Verwendung von RNA-geleiteten Endonukleasen in monokotylen und dikotylen Pflanzen entwickelt. Die Vektoren des CasCADE-Systems ermöglichen eine schnelle und vergleichsweise einfache Klonierung von individuellen Expressionskassetten und komplexen Transformationsvektoren. Zudem wird durch die Flexibilität der einzelnen Module gewährleistet, dass auch Neuerungen auf dem Fachgebiet leicht in das bestehende Vektorsystem implementiert werden können. Die CasCADE-Vektoren wurden umfassend anhand von Protoplasten und stabil transformierten Pflanzen getestet und haben sich dabei als sehr verlässlich erwiesen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden das *Lr67/Stp13*-Gen von Weizen und Gerste gezielt mit RNA-geleiteten Endonukleasen mutiert. Hintergrund dieses Ansatzes ist die der Literatur entnommenen Entdeckung eines Resistenz-vermittelnden *Lr67res*-Allels des Weizens. Ausschlaggebend für die Resistenz ist ein SNP im *Lr67*-Homöoallel des D-Genoms. Mit dem Ansatz der gezielten Mutagenese sollten zum einen dem *Lr67res*-Allel möglichst ähnliche Genvarianten generiert werden und zum anderen neue potentiell Resistenz-vermittelnde Mutationen an unterschiedlichen Stellen des Gens erzeugt werden. Hierfür sind mehrere Konstrukte generiert worden, mit denen entweder nur ein Zielmotiv oder simultan je vier Zielmotive in den *Lr67/Stp13*-Genen von Weizen und Gerste adressiert wurden. Die daraus resultierenden Mutationen führten zu verschiedenen Veränderungen der *Lr67/STP13*-Proteinstruktur und erste Resistenztests mit ausgewählten Gerstenmutanten haben ergeben, dass vier Mutanten potentiell resistent gegen Braunrost sind.

4. Diskussion

Die wachsende Weltbevölkerung und der Klimawandel stellen ernstzunehmende Herausforderungen für eine weltweit stabile Lebensmittelversorgung dar. Die neuen Züchtungstechniken, allen voran die Genomeditierung mittels programmierbarer Endonukleasen, können einen Beitrag leisten, um die Nahrungsproduktion zu steigern, die Pflanzen an den Klimawandel anzupassen und den Einsatz von Dünger und Pflanzenschutzmittel zu reduzieren. Mit Hilfe der RNA-geleiteten Endonukleasen können gewünschte genetische Veränderungen relativ einfach, schnell und präzise hervorgerufen und/oder in Elitematerial übertragen werden.

In dieser Arbeit wurde das modulare Vektorsystem CasCADE erstellt, das eine schnelle und einfache Assemblierung von gRNA/*cas9*-Expressionsvektoren ermöglicht und gleichzeitig sehr flexibel ist. Die praxisrelevante Anwendung des CasCADE-Systems wurde anhand der gezielten Mutagenese des Kandidatengens *Lr67/Stp13* in Weizen und Gerste gezeigt.

4.1. Etablierung des CasCADE-Systems

Mit dem CasCADE-Vektorset lassen sich schnell und einfach Vektoren für die gezielte Mutagenese von Kandidatengenen in mono- und dikotylen Pflanzen generieren. Insgesamt sind drei *Golden-Gate*-Klonierungsschritte notwendig, um Transformationsvektoren für die Mutagenese von Zielmotiven der Wahl zusammenzubauen (Abbildung 47). Vektoren im unmittelbar entstehenden Format können für den direkten DNA-Transfer (Protoplasten-Assay oder biolistische Transformation) verwendet werden. Für den Agrobakterien-vermittelten DNA-Transfer kann ein die assemblierten Module enthaltendes Fragment dieser Vektoren in kompatible Generische Binärvektoren übertragen werden, die bereits ein Selektionsmarkergen der Wahl für Pflanzen enthalten.

In dem ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst getestet, ob prinzipiell die Generierung der Expressionsvektoren effizient funktioniert und die verwendeten Elemente funktional sind. Ausschlaggebend für eine effiziente *Golden-Gate*-Klonierung sind die gewählten Überhänge der zu assemblierenden Module. Für das CasCADE-System wurden die meisten Modul-Überhänge aus dem System von Ordon et al. (2017) übernommen, allerdings sind die beiden Vektorsysteme hinsichtlich des Zusammenbaus von sinnvollen Expressionskassetten nicht miteinander kompatibel, da sie prinzipiell unterschiedlich aufgebaut sind.

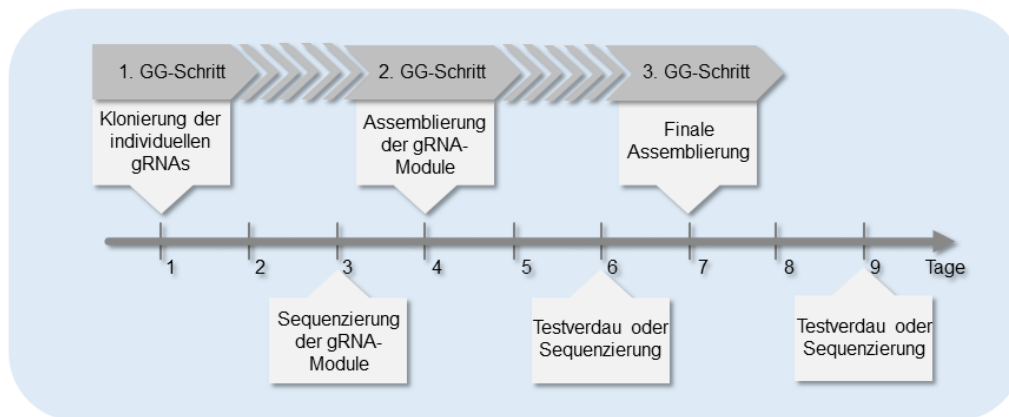


Abbildung 47: Zeitplan der drei Klonierungsschritte In insgesamt drei *Golden-Gate* (GG) Klonierungsschritten lassen sich individuell auf bestimmte Zielmotive zugeschnittene gRNA/*cas9*-Expressionsvektoren erstellen. Zunächst werden die Generischen gRNA-Modulvektoren mit dem spezifischen Teil (i.d.R. 20 bp) je einer gRNA ergänzt. Die dabei entstehenden gRNA-Modulvektoren werden im zweiten Schritt in einem assemblierten gRNA-Vektor zusammengeführt. Im finalen Schritt werden dann der gRNA-Vektor, der Endonuklease-Vektort und ein Auxiliärer Modulvektor der Wahl im Generischen Transformationsvektor miteinander kombiniert.

Anhand der Mutagenese von *HvLox1* in transienten Expressionstests wurde das CasCADE-System erfolgreich validiert. Die Mutationseffizienz erreichte bis zu 65 % im Protoplasten-Assay und bis zu 88 % im biolistischen Testsystem.

Im zweiten Teil wurde das System, wie im Ergebnisteil beschrieben, für die gezielte Mutagenese von *Lr67/STP13* in Weizen und Gerste verwendet. In diesem Zusammenhang wurden stabil transformierte Gersten-Pflanzen mit einer Mutationseffizienz von bis zu 84 % hergestellt.

4.2. Vergleich von modularen Vektorsystemen

In der Molekularbiologie und Biotechnologie sind eine Reihe von Vektorsystemen gut etabliert. Bereits 1996 wurde das NOMAD-System zur gezielten Klonierung von einzelnen DNA-Fragmenten publiziert (Rebatchouk et al., 1996). Mit der Entwicklung der *Golden-Gate*-Klonierung wurde der Weg für modulare Systeme geebnet, die die Klonierung von mehreren Fragmenten in nur einer Reaktion ermöglichten (Engler et al., 2008). In den letzten Jahren wurden verschiedene modulare Systeme für die Anwendung der gRNA/Cas9-Technologie in Pflanzen publiziert, die sich in den Grundzügen ähneln (z.B.: Ma et al., 2015; Xing et al., 2014; Lowder et al., 2015; Ordon et al., 2017; Čermák et al., 2017; Hahn et al., 2020). Dennoch gibt es auch deutliche Unterschiede zwischen den Systemen. In Tabelle 28 werden die zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit bekannten Systeme für Multiplex Genomeditierungs-Anwendungen in Pflanzen verglichen. Dabei werden die wichtigsten Merkmale wie die Promotoren für die gRNA-

und *cas9*-Expression, die maximal mögliche Anzahl an gRNAs, die Cas-Varianten und Codon-Optimierungen, getestete Pflanzenarten und die Klonierungsstrategie angeben. Das in dieser Arbeit erstellte CasCADE-System ist in dieser Tabelle gelb markiert.

Die „frühen Systeme“ umfassen bereits eine große Bandbreite an Expressionsvektoren, jedoch sind diese Systeme vergleichsweise unflexibel hinsichtlich der Kombinierbarkeit verschiedener Module. Darüber hinaus erfolgt die Assemblierung der Module bei zwei Systemen direkt in den großen Binärvektoren, was zu Problemen bei der Effizienz der Klonierungsschritte führen kann (Ma et al., 2015; Xing et al., 2014). Außerdem werden in diesen Systemen noch verschiedene Klonierungsprinzipien miteinander kombiniert (*Gateway* oder *Gibson Assembly* und *Golden Gate*) während in den späteren Systemen, wie auch in CasCADE, nur die einfache und zuverlässige *Golden-Gate*-Klonierung verwendet wird. Einige Systeme bauen auf etablierten Klonierungssystemen für molekularbiologische und biotechnologische Anwendungen auf. So wurden zum Beispiel Module zur Genomeditierung zu dem 2011 publizierten MoClo-System ergänzt (Weber et al., 2011; Lawrenson et al., 2015; Ordon et al., 2017; Kumar et al., 2018; Hahn et al., 2020). Ebenso wurde das 2011 publizierte GoldenBraid-System um Module für die Genomeditierung erweitert (Sarrion-Perdigones et al., 2011; Vazquez-Vilar et al., 2016; Vazquez-Vilar et al., 2021). In Tabelle 28 sind ausschließlich die jeweilig neusten, in diesen Publikationen vorgestellten Versionen aufgeführt. Jedoch enthalten das MoClo- und das GoldenBraid-System viele weitere Module, wie zum Beispiel Promotoren, 5'-untranslatierte Regionen, Signalpeptide, Codierungssequenzen und Terminatoren für unterschiedliche experimentelle Ansätze (Weber et al., 2011; Sarrion-Perdigones et al., 2011).

Module auf bereits publizierten Systemen aufzubauen, kann vorteilhaft sein. Zum einen muss ein System nicht von Grund auf neu hergestellt und etabliert werden und zum anderen wird nicht nur die Anzahl der Module, sondern auch die Vielfalt der Anwendungen durch die Zusammenarbeit von verschiedenen Laboren maximiert, wenn die verschiedenen Module miteinander kompatibel sind.

Nächste Seite: **Tabelle 28: Vergleich von modularen Vektorsystemen für gRNA/Cas9-Anwendungen in Pflanzen**

Systemname, Referenz	Promotor		Max. Anzahl gRNAs	Cas ¹ -Variante; Codon- Optimierung ²	Nachweise induzierter Mutationen	Erforderliche Klonierungs- Prinzipien
	Endonuklease	gRNA				
Xing et al., 2014	2x35S, ZmUbi1	AtU6-29, AtU6-26, AtU6-1, OsU3, TaU3	3	Cas9; Human, Mais	<i>Arabidopsis</i> : M ₂ Mais: M ₁	Golden Gate/ Gibson Assembly
Ma et al., 2015	2x35S, ZmUbi	AtU3b, AtU3d, AtU6- 1, AtU6-29, OsU3, OsU6a, OsU6b, OsU6c	8	Cas9; Pflanze	<i>Arabidopsis</i> : M ₂ Reis: M ₂	Golden Gate/ Gibson Assembly
Lowder et al., 2015	35S	AtU3, AtU6, OsU3, OsU6-2	8 für Dicots, 3 für Monocots	Cas9, Cas9-D10A, dCas9, dCas9-VP64, dCas9-SRDX; Pflanze, <i>Arabidopsis</i> , Human	Reis: M ₁ Tabak: transiente Expression	Golden Gate/ Gateway
Xie et al., 2015	OsUbi	OsU3	8	Cas9; Human	Reis: M ₁	polycistronisch
Čermák et al., 2017	2x35S, ZmUbi, CmYLCV, M24, FMV, nos, AtUbi10, OsAct1, PvUbi1, PvUbi2, AtEc1.2, AtYao	AtU6, At7SL, TaU3, TaU6, OsU3, OsU6, CmYLCV, PvUbi1	12	Cas9, Cas9-D10A, Cas9-H840A, dCas9, dCas9-VP64, dCas9- VPR; Weizen, <i>Arabidopsis</i>	Tomate, Gerste, Weizen: Protoplasten; Tabak: transiente Expression <i>M. truncatula</i> : M ₃	Golden Gate/ polycistronisch
CasCADE, Hoffie et al., in Vorbereitung	ZmUbi1, 2x35S, PcUbi4-2	OsU3, TaU6, AtU6-26	4	Cas9, Cas9-D10A, xCas9, xCas9-D10A, Cas9-NG, Cas9- D10A-ADA, Cas9- D10A-CDA; Mais, <i>Arabidopsis</i>	Gerste: M ₂ Weizen: M ₂ Mais: M ₂ <i>Arabidopsis</i> : M ₂ <i>Camelina</i> : M ₄	Golden Gate
<i>Module aufbauend auf dem MoClo-System</i>						
Lawrenson et al., 2015	CsVMW, ZmUbi	AtU6-26, TaU6	2	Cas9; Human	Gerste: M ₃ <i>B. oleracea</i> : M ₃	Golden Gate
pDGE, Ordon et al., 2017	2x35S, PcUbi4-2, AtDd45, lcu2	AtU6-26	8	Cas9, dCas9, dCas9- AD ^{TAL} ; <i>Arabidopsis</i>	Tabak: M ₂ <i>Arabidopsis</i> : M ₄	Golden Gate
pMGE, Kumar et al., 2018	ZmUbi	HvU3, OsU3, OsU6, TaU6	6 8 (OsU6)	Cas9; <i>Arabidopsis</i>	Gerste: M ₂	Golden Gate
Hahn et al., 2020	2x35S, PcUbi4-2, CmYLCV, OsAct1, PvUbi1, GmUbi	TaU3, TaU6, OsU3, OsU6-2, AtU6-26	Regulär 6, mehr möglich	Cas9, Cas9-NG, xCas9, SaCas9, StCas9, ScCas9, ScCas9-D10A-ADA, Cas9-D10A-CDA, FnCas12a, LbCas12a, SmCms1, SuCms1, MiCms1, ObCms1; Human, Weizen, <i>Arabidopsis</i> , Reis, Monocot	Weizen: nur cTa-Cas9 in Protoplasten getestet	Golden Gate/ polycistronisch

Fortführung **Tabelle 28:**

Systemname, Referenz	Promotor		Max. Anzahl gRNAs	Cas ¹ -Variante; Codon- Optimierung ²	Nachweise induzierter Mutationen	Erforderliche Klonierungs- Prinzipien
	Endonuklease	gRNA				

Module aufbauend auf dem GoldenBraid-System

gRNA-Cas9 GB toolbox, Vazquez-Vilar et al., 2016; Vazquez-Vilar et al., 2021	35S	AtU6-26, AtU6-1, OsU3	6	SpCas9, dCas9, dCas9-SRD _X , dCas9- VP64, dCas9-BRD, dCas9-EDLL, LbCas12a, dCas12a, dCas12a-BRD; Human, Pflanze	Tabak: M ₂	Golden Gate/ polycistronisch
---	-----	--------------------------	---	--	-----------------------	---------------------------------

Ergänzungen zu Tabelle 28: Icu2: *Incurvata2 Promotor*; AtDd45: AT2G21740 Promotor; AtYao: At4g05410 Promotor; OsUbi : *Oryza sativa Ubiquitin* Promotor; PvUbi1 und PvUbi2: *Panicum virgatum Ubiquitin1* und *Ubiquitin2* Promotor; CmYLCV: Cestrum Yellow Leaf Curling Virus Promotor; GmUbi: *Glycine max Ubiquitin* Promotor; CsVMW: Cassava Vein Mosaic Virus Promotor ; 35S: Cauliflower mosaic virus 35S Promotor; 2x35S: Zweifach verstärkter 35S Promotor; ZmUbi1: *Zea mays Ubiquitin1* ; M24: Mirabilis mosaic virus Promotor; FMV: Figwort mosaic virus Promotor; AtEc1.2: *Arabidopsis* Egg cell-specific Promotor; OsAct1: *Oryza sativa Actin1* Promotor; PcUbi4-2: *Petroselinum crispum Ubiquitin4-2* Promotor; AtU3: *Arabidopsis thaliana* snRNA (small nuclear RNA) U3, U3b, U3d Promotor ; AtU6: *Arabidopsis thaliana* snRNA U6-1, U6-26 und U6-29 Promotor ; OsU3: *Oryza sativa* snRNA U3 Promotor ; OsU6: *Oryza sativa* snRNA U6, U6a, U6b, U6c, U6-2 Promotor ; HvU3: *Hordeum vulgare* snRNA U3; TaU3: *Triticum aestivum* snRNA U3 Promotor; TaU6: *Triticum aestivum* snRNA U6 Promotor ; Cas9-D10A: Nickase; Cas9-H840A: Nickase; dCas9: *dead* Cas9, katalytisch inaktiv; SaCas9: *Staphylococcus aureus* Cas9; StCas: *Streptococcus thermophilus* Cas9; ScCas9: *Streptococcus canis* Cas9; FnCas12a: *Francisella novicida* Cas12a; LbCas12a: *Lachnospiraceae bacterium* Cas12a; Cms: CRISPR from *Microgenomates* and *Smithella*; SmCms1: *Smithella* sp. Cms1; *Microgenomates* sp. Cms1; SuCms1: *Sulfuricurvum* sp. Cms1; ObCms1: *Omnitrophica bacterium* Cms1; ADA: Adenin-Deaminase; CDA: Cytidin-Deaminase; VP64, VPR, AD^{TAL}, EDLL: Transkriptions-Aktivator; BRD, SRDX: Transkriptions-Repressor; pDGE: Dicot Genome Editing Vectors; pMGE: Monocot Genome Editing Vectors; GB: Golden Braid; *M. truncatula*: *Medicago truncatula*; M1-M4: Mutierte Filialgenerationen 1-4; ¹ : Es handelt sich um *Streptococcus pyogenes* Cas9-Derivate, außer es wurde anders angegeben; ² : Die detaillierten Codon-Optimierungen der jeweiligen Cas-Derivate sind in den Referenzen zu finden.

Ein weiterer Aspekt ist, dass sich die Anwendung der gRNA/Cas9-Technologie nicht nur auf die Genomeditierung beschränkt, sondern zunehmend auch für andere Modifikationen, z.B. die gezielte Aktivierung oder Repression von Genen, verwendet wird. Einige Vektorsysteme stellen für solche Anwendungen dCas (*dead* Cas, beide katalytischen Domänen deaktiviert) -Fusionen mit Aktivatoren oder Repressoren zur Verfügung (Čermák et al., 2017; Hahn et al., 2020; Vazquez-Vilar et al., 2021). Jedoch können solche vielfältigen Systeme auch schnell unübersichtlich und kompliziert in der Anwendung werden, da sie ursprünglich eben nicht nur für Anwendungen der Genomeditierung entwickelt wurden. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb die Entwicklung eines robusten, einfach anzuwendenden, aber dennoch flexiblen und funktional breit

aufgestellten Systems für die gezielte Genom-Modifikation von verschiedenen Pflanzenarten.

Für CasCADE werden, wie auch für die meisten anderen Systeme, RNA-Polymerase III-kompatible Promotoren für die Expression der gRNAs verwendet. Die U3- und U6-Transkripte werden nicht post-transkriptional prozessiert, brauchen also nicht aus dem Zellkern heraustransportiert werden und ein kurzer T-Stretch reicht als Terminationssignal aus (Nielsen et al., 2013; Ordon et al., 2017). Zudem sind Pol III-Promotoren relativ klein, sehr aktiv (eine große Menge an Transkripten wird produziert) und sie haben genau definierte Transkriptionsstarts (Adenin und Guanin) (Gao et al., 2017). Dies limitierte allerdings zunächst auch die Auswahl der Zielregionen auf AN₂₀GG und GN₂₀GG bei der Verwendung von U3- und U6-Promotoren (Belhaj et al., 2013), was jedoch später durch die Option 5'-terminaler Ergänzung von gRNAs durch ein A oder G auf einfache Weise überwunden wurde (Shan et al., 2014). Die Verwendung von RNA-Polymerase II (Pol II) -Promotoren im Sinne einer freieren Auswahl von Zielmotiven ist daher unnötig. Zudem werden die von Pol II-Promotoren exprimierten mRNAs an den Enden prozessiert, was einen erheblichen Einfluss auf die Struktur und der damit verbundenen Bindefähigkeit der gRNA hat. Zu den Pol III-gRNA-Transkriptionssystemen gibt es jedoch weitere Alternativen. So wird z.B. in mehreren Vektorsystemen die Möglichkeit genutzt, dass polycistronische mRNAs von RNA Pol II- oder Pol III-Promotoren transkribiert werden und post-transkriptional von RNA-schneidenden Enzymen in einzelne gRNAs prozessiert werden (Xie et al., 2015; Čermák et al., 2017, Hahn et al., 2020; Vazquez-Vilar et al., 2021). Dafür müssen jedoch für die jeweiligen Enzyme zwischen den gRNAs spezifische Erkennungssequenzen, sogenannte *Spacer*, platziert werden. Ein häufig verwendetes System ist darüber hinaus die tRNA-*Spacer*-Methode, in der die tRNAs von den für Pflanzen endogenen RNase P und RNase Z Enzymen prozessiert werden (Xie et al., 2015; Čermák et al., 2017; Hahn et al., 2020; Vazquez-Vilar et al., 2021). Dieses tRNA-gRNA-System hat zum Beispiel schon mit hohen Effizienzen in stabil transformierten Reis- und Tabakpflanzen funktioniert (Xie et al., 2015; Vazquez-Vilar et al., 2021). Weitere Systeme zur Prozessierung von polycistronischen Transkripten basieren auf der Verwendung der aus *Pseudomonas aeruginosa* stammenden CRISPR-assoziierten RNA-Endoribonuklease Csy4 oder dem selbstprozessierenden Hammerhead-Ribozym (Čermák et al., 2017). Čermák et al. (2017) haben alle drei polycistronischen Systeme in ihr Vektorsystem integriert und konnten anhand transienter Expression zeigen, dass das tRNA-gRNA-System und Csy4-System

signifikant effizienter als das Ribozym-System und auch effizienter als die gRNA-Expressionssysteme verglichener Pol III-Promotoren sind. Des Weiteren wurde die Funktionalität der tRNA-gRNA- und Csy4-Systeme in stabil transformierten *Medicago truncatula*-Pflanzen gezeigt (Čermák et al., 2017). Jedoch ist die Klonierung solcher polycistronischen gRNA-Systeme im Vergleich mit der Verwendung von einzelnen Pol III-Promotoren für den Anwender aufwändiger. Zudem wurde die Funktionalität der alternativen Expressionssysteme noch nicht in stabil transformierten Weizen- oder Gerstenpflanzen gezeigt, während das Pol III-System bereits solide etabliert ist. Deswegen wurde im CasCADE-System zunächst nur das Pol III-System verwendet, während jedoch jederzeit die Möglichkeit besteht, die CasCADE-Plattform um ein alternatives Expressionssystem für gRNAs zu erweitern. Außerdem wurde das CasCADE-System mit strukturell modifizierten gRNA-*Scaffolds* ergänzt, die entsprechend vorläufiger Ergebnisse anhand von Protoplasten eine höhere gRNA-Expression und effizientere Interaktion mit dem Cas9-Enzym aufweisen (Chen et al., 2013, S. Hiekel (IPK Gatersleben), persönliche Mitteilung). Diese *Scaffolds* werden aktuell noch in stabil transformierten Pflanzen getestet. Des Weiteren lassen sich in CasCADE alle Module für die *cas9*-Expression (Promotoren, Cas-Varianten, Terminatoren) frei miteinander kombinieren. Dies hat zum einen den Vorteil, dass individuelle Expressionskassetten zusammengestellt werden können, zum anderen können neue Entwicklungen schnell und unkompliziert in das Vektorsystem integriert werden. Die gRNA/Cas9-Technik ist eine vergleichsweise junge Technologie und dementsprechend wird es auch weiterhin viele Weiterentwicklungen geben. Das hat zur Folge, dass zum Beispiel neue Endonuklease-Derivate verfügbar werden, die eine höhere Effizienz ermöglichen, die Anwendung der Technologie weiter vereinfachen oder neue Funktionen aufweisen. So wurden in den letzten Jahren die artifiziellen SpCas9-Derivate xCas9 (Hu et al., 2018) und Cas-NG (Nishimasu et al., 2018) entwickelt, die mehr Flexibilität in der Auswahl der Zielsequenzen erlauben, da sie geringere Anforderungen an die PAM-Sequenz haben als die herkömmliche SpCas9. Beide Varianten wurden in CasCADE integriert und werden bezüglich ihrer Eignung noch weiter validiert. Das aktuelle Set wird durch die beiden Baseneditoren Cytidin-Deaminase (Nishida et al., 2016) und Adenin-Deaminase (Li et al., 2018) komplementiert. Erste Experimente mit der Cytidin-Deaminase zeigten bereits Mutationseffizienzen von bis zu 54 % in stabil transformierten Gerstenpflanzen (R. Hoffie (IPK Gatersleben), persönliche Mitteilung). Hahn et al. (2020) haben in ihrem Vektorsystem ebenfalls verschiedene Cas9-Derivate und Baseneditoren integriert, jedoch wurden dazu keine

Anwendungsdaten präsentiert. In einigen Vektorsystemen kann zudem zwischen der SpCas9 und Cas-Endonukleasen aus anderen Organismen, wie zum Beispiel der *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) oder *Lachnospiraceae bacterium* Cas12a (LbCas12a), gewählt werden (Hahn et al., 2020; Vazquez-Vilar et al., 2021). Für das CasCADE-System sind Cas-Endonukleasen aus anderen Organismen für die Verwendung in Gerste noch in der Validierungsphase und damit nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Im CasCADE-System besteht nicht nur bezüglich der Verwendung von Cas9-Derivaten eine hohe Flexibilität, sondern auch die Promotor- und Terminator-Module lassen sich individuell kombinieren. In einigen Vektorsystemen steht für die *cas9*-Expression in dikotylen Pflanzenarten nur der 35S-Promotor zur Verfügung (Xing et al., 2014; Ma et al., 2015; Lowder et al., 2015). Jedoch wurde gezeigt, dass der 35S-Promotor für eine effiziente Genomeditierung von *Arabidopsis* mittels der Floral Dip-Transformationsmethode nicht gut geeignet ist, da der Promotor nur eine geringe Aktivität im weiblichen Fortpflanzungsgewebe, aber eine hohe in somatischen Gewebe hat (Yan et al., 2015). Effizienter sind z.B. der AtYAO (Yan et al., 2015) oder PcUbi4-2-Promotor, der sowohl in CasCADE als auch in anderen Vektorsystemen implementiert wurde (Čermák et al., 2017; Ordon et al., 2017; Hahn et al., 2020). Des Weiteren steht dem CasCADE-System für die *cas9*-Expressionseinheit neben dem oft verwendeten *nos*-Terminator ein 35S-t::nos-t Doppelterminator zur Verfügung. Für diesen Doppelterminator wurde beispielsweise gezeigt, dass die transiente Genexpression im Vergleich mit der Verwendung der Einzelterminatoren deutlich gesteigert ist (Beyene et al., 2011). Eine weitere Besonderheit des CasCADE-Systems ist das auxiliäre Modul, das entweder als Multiple Klonierungsseite dient oder die Expression eines Reportergens ermöglicht.

Generell fällt bei vielen publizierten Vektorsystemen auf, dass sie entweder nur in Protoplasten (Hahn et al., 2020) und/oder nur in wenigen stabil transformierten Pflanzenarten getestet wurden. Die Ergebnisse aus Protoplasten geben zwar einen ersten Hinweis auf die Funktionalität, lassen jedoch keine verlässlichen Rückschlüsse auf stabil transformierte Pflanzen zu, da sich die Expression von gRNAs und *cas9* und die Reparaturmechanismen abhängig von der Pflanzenart und dem Zelltyp erheblich unterscheiden können. Nur einige Modulerweiterungen des MoClo-Systems (Lawrenson et al., 2015; Kumar et al., 2018) wurden bisher anhand stabil transformierter Gersten- oder Weizenpflanzen getestet, wobei dies zwei der wichtigsten Getreidearten sind und daher auch für die angewandte Forschung eine besonders hohe Relevanz gegeben ist.

Allerdings sind diese Getreidearten auch besonders anspruchsvoll in der biotechnologischen Handhabung - insbesondere wenn es um deren Transformierbarkeit geht. Für das CasCADE-System wurden daher nur vorvalidierte Elemente verwendet, um eine maximale Performance in den verschiedenen Pflanzenarten zu gewährleisten. Mit der Gewissheit, dass alle verwendeten Elemente sowie deren modularer Zusammenbau gut funktionieren, wurde das System bisher erfolgreich für die gezielte Genom-Modifikation von Zielgenen von Mais, Gerste, Weizen, *Arabidopsis* und *Camelina* verwendet. Bis *dato* wurden anhand dieses Artenspektrums bereits über 50 verschiedene Gene mit Hilfe des CasCADE-Systems verändert. Dabei geht es sowohl um Experimente zur Aufklärung von Genfunktionen als auch um Ansätze zur Verbesserung von Eigenschaften der Kulturpflanzen. Diese Studien werden entweder gruppenintern oder in Kooperation mit externen Partnern verfolgt und sind nicht Gegenstand dieser Arbeit. Zusammengefasst wurde anhand dieser Beispiele belegt, dass CasCADE über eine vergleichsweise große Palette monokotyle und dikotyle Pflanzenarten verwendbar ist und mit hoher Effizienz heritable Mutationen induziert werden können. Somit bietet CasCADE ein zuverlässiges und multifunktionales Vektorsystem sowohl für die Grundlagen- als auch angewandte Forschung, insbesondere in Getreidepflanzen.

4.3. Etablierung einer Lr67-basierten Resistenz

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer *Lr67*-basierten Pilzresistenz in Gerste und Weizen, was gleichzeitig als Validierung des CasCADE-Vektorsystems vorgesehen war. Grundlage dafür ist eine in Weizen entdeckte Allel-Variante (*Lr67res*) des *Stp13*-Gens, die mit einer partiellen, aber multiplen Resistenz gegen alle Arten von Rostpilzen und Mehltau assoziiert wird (Moore et al., 2015). Nicht nur die Breitenwirksamkeit macht die *Lr67res*-vermittelte Resistenz so interessant, sondern auch die bislang unerreichte Beständigkeit. Trotz dieser Vorteile wurde *Lr67* in modernen, kurzstrohigen Sorten vermutlich aufgrund der genetischen Kopplung mit dem *Rht-D1*-Wildtypallel bislang nicht genutzt (Moore et al., 2015). In Zukunft ist damit zu rechnen, dass sich durch veränderte klimatische Bedingungen und den reduzierten Einsatz von Fungiziden Rostkrankheiten ausbreiten werden. Um diese Resistenz weiter zu erforschen und für die Züchtung aktueller Sorten zu erschließen, wurden in dieser Arbeit mittels der gRNA/Cas9-Technologie eine breite Palette von Weizen- und Gerstenpflanzen mit *Lr67/Stp13*-spezifisch induzierten Mutationen generiert. Hier lag der Fokus auf der Erzeugung neuer Genvarianten, die auf prinzipiell gleiche Weise

Resistenz bewirken könnten. Ausgewählte *HvStp13*-Mutanten wurden unter Gewächshausbedingungen auf die Wirksamkeit ihrer Resistenz überprüft. Im Nachgang der vorliegenden Arbeit ist darüber hinaus auch geplant die Resistenz-vermittelnde Mutation des *Lr-D67res*-Allels identisch nachzubilden.

4.3.1. Erzeugung von *Lr67*-Mutanten im Weizen

Der zunächst in Weizen beschriebene Resistenzlokus *Lr67res* beruht kausal auf einem Basenaustausch im zweiten Exon des *Lr-D67*-Gens. Durch diesen SNP kommt es zum Aminosäureaustausch G144R in der vierten Transmembrandomäne, was in reduziertem Zuckertransport resultiert (Moore et al., 2015). Eine Co-Expression von *Lr67res* mit den drei funktionalen Homeoallelen *Lr-A67*, *Lr-B67* oder *Lr-D67sus* führte ebenfalls zu einer Reduktion des Zuckertransports. Zudem konnte in BiFC-Assays gezeigt werden, dass die Homeoallele miteinander interagieren (Moore et al., 2015; Huai et al., 2020). Dies führte zur Hypothese, dass die Resistenz auf einer dominant negativen Interferenz mit den *Lr67*-Homeoallelen beruht (Moore et al., 2015).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden zunächst einzelne gRNAs zur gezielten Mutagenese von verschiedenen Zielmotiven in der Weizensorte ‚Bobwhite‘ verwendet. Der Grund dafür war, dass das CasCADE-System zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand. Aus diesen ersten Experimenten ist eine Primärmutante hervorgegangen (WI3E33), deren Mutationen auch an die Nachkommenschaften vererbt wurden. Wie erwartet wurden Mutationen im ersten Zielmotiv in den Homeoallelen im D- und A-Genom detektiert. Überraschenderweise wurden auch Mutationen in *Lr-B67* detektiert, obwohl es zwischen der gRNA und dem Zielmotiv eine Basenfehlpaarung gibt, die gRNA also nicht 100 % komplementär zu dem Zielmotiv war. Die gRNA1 hat drei potenzielle *Off-Targets* mit jeweils einem *Mismatch* (inklusive *Lr-B67*) und in Zukunft sollten die beiden *Off-Target*-Bereiche auf den Chromosomen 2B und 6B auch auf Mutationen untersucht werden. Das Mutationsspektrum im ersten Zielmotiv reichte von 6 bis 16 bp-großen Deletionen. Einige Pflanzen waren für das erste Zielmotiv bereits homozygot. Jedoch waren alle Pflanzen heterozygot für das fünfte Zielmotiv, das wiederum ausschließlich in *Lr-D67* mutiert war. In der nächsten Generation sind Segreganten zu erwarten, die sowohl für das erste als auch das fünfte Zielmotiv homozygot sind. Dann wird sich auch zeigen, welche Mutationen in dem fünften Zielmotiv entstanden sind. Für die gRNA5 gibt es keine potentiellen *Off-Targets*.

Parallel zu den ersten *Lr67*-Experimenten wurde das CasCADE-System fertiggestellt und für die weiteren Experimente verwendet. Insbesondere erschien dabei von Vorteil, dass nun bis zu vier gRNAs simultan exprimiert werden konnten. Verschiedene gRNAs können sich bezüglich ihrer Effizienz erheblich unterscheiden und mit dem Einsatz von vier gRNAs steigt die Wahrscheinlichkeit, dass zumindest in einem Zielmotiv Mutationen entstehen. Bei der Auswahl der gRNAs für die Folgeexperimente wurde auf die gängigsten Kriterien für hohe Mutationseffizienz geachtet, allerdings lag die Priorität darauf, den vorgegebenen Zielbereich zu erreichen. Um eine *Lr67*-Resistenz zu etablieren, sollten die Zielmotive möglichst in der Nähe oder direkt am G144R verursachenden SNP liegen. Ein weiterer Versuch zielte darauf ab, neue *Lr67*-Varianten zu generieren, die aber möglichst den gleichen Resistenz-vermittelnden Effekt wie *Lr-D67res* haben. Für die Auswahl dieser gRNAs wurde darauf geachtet, dass die Zielmotive in den flankierenden Transmembrandomänen liegen. In der *Off-Target*-Analyse wurden für die gRNAs 3, 9, 10, 11 und 13 potenzielle *Off-Targets* (drei, vier, fünf, vier und eins respektive) ermittelt. In Zukunft sollten bei weiterer Verwendung der generierten *Lr67*-Mutanten auch die potenziellen *Off-Targets* auf Mutationen untersucht werden.

Es wurden zwei gRNA/Cas9-Konstrukte mit jeweils vier gRNAs erstellt, die beide für die biolistische Transformation der Sorten ‚Taifun‘ und ‚Bobwhite‘ verwendet wurden. Die Sorte ‚Bobwhite‘ ist Mitte 1970 aus einer Kreuzung von CM33203 im CIMMYT (The International Maize and Wheat Improvement Center) -Weizenprogramm hervorgegangen und hat sich seitdem als Standardsorte für die Weizentransformation etabliert. Allerdings wurden alle 129 Akzessionen, die aus dieser Kreuzung hervorgingen, als ‚Bobwhite‘ bezeichnet, was zu Problemen in der Reproduzierbarkeit zwischen Arbeitsgruppen geführt hat (Pellegrineschi et al., 2002). Von manchen ‚Bobwhite‘-Akzessionen ist bekannt, dass sie anfällig für Mehltau sind (Zeller et al., 2013). Auch die in dieser Arbeit verwendete ‚Bobwhite‘-Akzession ist sehr anfällig für Mehltau, was oftmals schon zu Kultivierungsproblemen geführt hat. Außerdem handelt es sich dabei nicht mehr um aktuelles Zuchtmaterial und es wäre von Vorteil, neuere Sorten oder Zuchtlinien für Transformationen und somit für die Forschung zu verwenden. Aufgrund dessen wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Transformationsexperimente mit ‚Taifun‘ gemacht. Der Qualitätsweizen ‚Taifun‘ (KWS Lochow, 2003) ist sehr anfällig für Braunrost, aber nur mäßig anfällig für Mehltau und Gelbrost. Die Experimente zur Transformierbarkeit von ‚Taifun‘ sind noch nicht abgeschlossen und waren auch nicht Bestandteil dieser Arbeit. Dennoch lässt sich bereits schlussfolgern, dass ‚Taifun‘

prinzipiell transformierbar ist und auch ähnliche Effizienzen wie mit ‚Bobwhite‘ erreicht werden können.

Die Mutationseffizienz wurde aus der Anzahl der mutierten Pflanzen im Verhältnis zu den insgesamt analysierten Pflanzen eines Experiments berechnet und in den Experimenten WI7-WI12 wurde eine Mutationseffizienz von bis zu 6,8 % erreicht. Dieser Wert liegt innerhalb der Spanne von 5 bis 17 % an Mutationseffizienz, die für bisher publizierte Studien zur gezielten Mutagenese von Weizen mittels Biolistik und Agrobakterien angegeben wurde (Wang et al., 2014; Howells et al., 2018).

In jedem Zielmotiv konnten Mutationen detektiert werden, oft auch in allen drei Homeoallelen innerhalb der gleichen Pflanze. Diese wurden zumeist von den T₀-Pflanzen in die nächste Generation vererbt. Das Mutationsspektrum reichte von 1 bp-Insertionen bis hin zu 69 bp-Deletionen in den verschiedenen Zielregionen. Einige mutierte Weizenpflanzen der T₁-Generation waren bereits transgenfrei. Somit kann hier davon ausgegangen werden, dass die Mutationen über die Keimbahn vererbt wurden. Dieses Phänomen beruht auf einer transienten Expression der gRNA/*cas9*-Kassette nach der Transformation ohne dass das Transgen stabil ins Genom integriert wurde.

Zwar gab es Unterschiede in den Effizienzen der gRNAs, was insbesondere in den sich überlappenden Zielbereichen von gRNA10 bis 12 und gRNA3 ersichtlich war, insgesamt wurden jedoch Mutationen sehr effizient erzeugt. Die vorrangig auftretenden Leserastermutationen (z.B. 1 bp-Insertionen, 1 bp oder 2 bp-Deletionen) führten zu einer veränderten Aminosäureabfolge oder zu einem vorzeitigen Stopcodon. Erste Vorhersagen der Proteinstrukturen lassen vermuten, dass bei einigen Mutanten (z.B. WI8E12-7, WI10E40-3) das Lr-D67-Protein nicht mehr funktional ist. Bei anderen Mutanten mit größeren Deletionen fehlen teilweise ganze Transmembrandomänen (z.B. fehlt bei WI8E12-8 ein Teil der vierten Transmembrandomäne und die gesamte fünfte Transmembrandomäne).

Das putative dominante Resistenzprinzip von *Lr67res* beim hexaploiden Weizen beruht darauf, dass ein homozygot mutierter Zustand für jeweils nur eines der drei Homeoallele ausreichend für die Etablierung von Resistenz ist. Bei der Auswahl der Zielmotive war aufgrund vorheriger Erfahrung nicht mit einer so hohen Effizienz gerechnet worden wie schließlich erreicht wurde, sondern erwartet, dass auch Mutationen in nur einzelnen Zielmotiven oder nur in einem Genom auftreten. Wie sich Mutationen in allen drei Homeoallelen auf den Zuckertransport auswirken, ist noch unklar und muss in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Um Einzelmutationen in der vierten Transmembrandomäne im Bereich des G144R verursachenden SNP zu erzeugen, wurde in Folgeexperimenten (WI16 bis WI19) nur die gRNA3 bzw. die gRNA3-1 verwendet. Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von ‚Bobwhite‘ mit jeweils einer dieser Vektorversionen führte zu Mutationseffizienzen von bis zu 21,4 %. Die gRNA3 (20 Nukleotide mit zwei bindenden Guanin-Nukleotiden am 5'-Ende) erwies im Vergleich zur gRNA3-1 (19 Nukleotide mit einem bindenden Guanin am 5'-Ende) etwas effizienter. Allerdings war der Anteil der mutierten Sequenzen in allen Pflanzen der Experimente WI16 bis WI19 sehr gering. Ob die detektierten Mutationen vererbt werden, wird sich zudem auch erst in der nächsten Generation zeigen.

Sobald eine Mutation oder ein Mutationsmuster genetisch fixiert ist, kann getestet werden, welche Auswirkungen sich daraus auf den Zuckertransport ergeben und ob dies zu einer Resistenz führt. Einen ersten Hinweis auf die Transportaktivität können heterologe Hefeassays geben, wie sie in Moore et al. (2015) und Milne et al. (2019) beschrieben wurden. Für diese Tests wurden Hefestämme verwendet, die defizient für den zellulären Zuckertransport sind. Durch die Expression von den verschiedenen *Lr67*-Varianten ließe sich in diesen Assays feststellen, ob der Zuckertransport in diesen Hefen ermöglicht wird oder weiterhin nicht stattfindet. Dieser Assay stellt ein relativ schnelles und einfaches *in vitro*-Experiment dar, bei dem erste Erkenntnisse über die Aktivität von Zuckertransportern erlangt werden können. Diese Ergebnisse sollten dann aber *in vivo* bestätigt werden. Die Weizenpflanzen, die in dieser Arbeit generiert wurden, befinden sich alle noch in der T₀- oder T₁-Generation und sind in den meisten Fällen noch chimär oder heterozygot. Sobald es homozygote Mutanten gibt, werden diese auch für erste Resistenztests verwendet.

Spielmeyer et al. (2013) und Moore et al. (2015) haben gezeigt, dass verschiedene durch Bestrahlung oder Ethylmethansulfonat-induzierte *Lr67*-Mutanten eine erhöhte Anfälligkeit für Rost- und Mehltaupilze hatten. Diese Mutanten hatten zumeist Punktmutationen in der sechsten Transmembrandomäne oder außerhalb der Transmembrandomänen von *Lr67*, die zu Aminosäure-Substitutionen führten, jedoch wurden diese Mutanten nicht weiter untersucht. Da durch die oben genannten Mutagenese-Techniken sehr viele Hintergrundmutationen entstehen können, ist nicht auszuschließen, dass auch andere Faktoren zu der erhöhten Anfälligkeit der beschriebenen Mutanten beigetragen haben können. Generell ist davon auszugehen, dass auch andere Mutationen als der G144R-Basenaustausch Auswirkungen auf den Zuckertransport und somit das Potenzial haben können, eine Resistenz zu vermitteln.

In der Annahme, dass die *Lr67*-vermittelnde Resistenz auf einer dominant-negativen Interferenz von *Lr67res* mit anderen *Lr67*-Homeoallelen beruht, ist für das zu mutierende Lr-D67-Protein die Bindefähigkeit zu anderen Lr67-Proteinen wichtig, um Oligomere zu formen. Solange die Bindefähigkeit gegeben ist, sollten verschiedene Mutationen, die den Zuckertransport unterbinden, denselben Resistenz-vermittelnden Effekt haben. Aufgrund dessen ist es durchaus vorstellbar, dass Mutationen, wie zum Beispiel größere Deletionen, die zu der Entfernung ganzer Transmembrandomänen führen, die Zuckertransportfähigkeit zwar verhindern, aber nicht die Oligomerisierung mit anderen Zuckertransportern stören und so zu Resistenz führen können. Mittels eines VIGS-Ansatzes konnten Huai et al. (2020) zeigen, dass eine Herunterregulierung von allen drei *Lr67*-Homeoallelen zu einer reduzierten Anfälligkeit für Gelbrost führt. Dies bestärkt die Hypothese, dass ein reduzierter Zuckertransport in die Zellen für die Etablierung einer Resistenz verantwortlich ist und dass eine Mutation in einem Homeoallel, die den Zuckertransport unterbindet, aber nicht die Oligomerisierung verhindert, ebenfalls Resistenz-vermittelnd sein kann.

4.3.2. Erzeugung von *Stp13*-Mutanten in der Gerste

Moore et al. (2015) und Milne et al. (2019) konnten zeigen, dass eine Übertragung des *TaLr67res*-Transgens in Gerste ebenfalls zu einer Resistenz gegen Braunrost und Mehltau führt. Die codierenden Sequenzen von *HvStp13* und *Lr67* sind zu 98,8 % identisch, was die Vermutung nahelegte, dass *HvStp13* ebenfalls ein potenzielles Resistenzgen sein könnte. Zudem wurde in heterologen Hefeassays gezeigt, dass HvSTP13 ebenfalls ein funktionaler Zuckertransporter ist und die mutierten STP13-Varianten HvSTP13-G144R (analog zum Resistenz-vermittelnden Weizen-Allel) und HvSTP13-V387L keinen bzw. weniger Zucker transportieren können (Milne et al., 2019). Basierend auf diesen Erkenntnissen, sollten in der vorliegenden Arbeit *HvStp13*-Mutanten erzeugt werden, um zu untersuchen, ob diese in Gerste ebenfalls zu einer Resistenz führen. Hierfür wurden acht Zielmotive ausgewählt und jeweils vier entsprechende gRNAs in zwei Konstrukten kombiniert. Dabei wurden Zielmotive ausgewählt, die sowohl in der Region des G144R-verursachenden Basenaustausches liegen als auch welche, die im ersten und dritten Exon in verschiedenen Transmembrandomänen liegen, um auch gegebenenfalls neuartige Resistenz-vermittelnde Allele generieren zu können. Teilweise konnten dabei die gRNAs für Weizen aufgrund gleicher Zielmotive in Gerste direkt übernommen werden. Alle verwendeten gRNAs haben keine vorhersagbaren *Off-Targets* in Gerste. Bereits in der

T₀-Generation wurden homozygot mutierte Pflanzen detektiert. Die Mutationsmuster in den verschiedenen Zielmotiven reichten von 1 bp-Insertionen, über 1 bp-Deletionen bis hin zu 114 bp-Deletionen zwischen zwei Zielmotiven. Alle Mutationen in der T₀-Generation wurden ausnahmslos an die T₁-Generation vererbt. Durch die unabhängige Segregation von T-DNA und induzierten Mutationen waren einige der T₁-Pflanzen transgenfrei, sodass eine „Neuentstehung der Mutationen“ in diesen Pflanzen ausgeschlossen werden kann und die Mutationen somit über die Keimbahn vererbt worden sein müssen. Für weitere Untersuchungen wurden zum einen Mutanten ausgewählt, die keine translationale Leserahmen-Verschiebung, also das Potenzial verbleibender, erwartungsgemäß aber deutlich reduzierter Funktionalität des Zuckertransporters aufweisen. Zum anderen wurden aber auch potenzielle Knock-out-Mutanten ausgewählt, um die Funktion von STP13 weiter zu erforschen.

Mit diesen Mutanten wurden vorläufige Resistenztests mit dem Braunrostpilz *Puccinia hordei* durchgeführt, in denen sich nach Inokulation mit den Pilzsporen zeigte, dass eine dieser Mutanten (BG891E01) sowohl im juvenilen als auch im adulten Stadium resistent gegen die Infektion war. Drei weitere Mutanten (BG897E21, BG897E30, BG897E33) wiesen ausschließlich im adulten Stadium Resistenz auf - so wie es von *Lr67*-Landrassen des Weizens bekannt ist. Diese vorläufigen Tests wurden jedoch nur mit drei bis vier Nachkommen pro Mutante durchgeführt und nur der Test für die APR wurde einmal wiederholt. Zudem wurden Pflanzen der T₁-Generation getestet und es gab entsprechend noch genotypische Unterschiede innerhalb der Nachkommenschaft einer Mutante. Um aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen, muss ein größerer Umfang an Pflanzen in mindestens drei Replikaten getestet werden. Auch für diese erzeugten *Stp13*-Mutanten wären heterologe Hefeassays aufschlussreich, um zu erfahren in wieweit der Zuckertransport durch die jeweiligen Mutationen beeinträchtigt wird. Bei einigen der erzeugten *HvStp13*-Mutanten (BG897E04, BG897E14 und BG897E15) wurden Wachstumsdepressionen bzw. eine verminderte Keimfähigkeit beobachtet. Wie durch die Sequenzierung von BG897E04-8 und BG897E14-2 sichtbar wurde, waren die entstandenen Mutationen vorrangig kleine Insertionen und Deletionen von mehreren Basen, die vermutlich zu einem Knock-out von *Stp13* geführt haben. Andererseits wurden bei den Pflanzen des Experiments BG891 keine negativen bzw. phänotypischen Effekte detektiert, obwohl die entstandenen Mutationsmuster vermutlich zu einem Knock-out von *Stp13* führen. In den vorläufigen Resistenztest wurde gezeigt, dass auch putative Knock-out Mutanten resistent gegen Braunrost sind. Dies könnte auf eine Übernahme des

Zuckertransports durch einen anderen, redundanten Zuckertransporter hindeuten, der zwar einen Zuckertransport in die Zellen gewährleistet, aber nicht in Folge einer Infektion hochreguliert wird und somit auch nicht von besonderem Vorteil für den Pilz wäre. Gerste ist eine diploide Art und somit liegt das *Stp13*-Gen in einfacher Ausführung vor und nicht wie im Fall von Weizen in Form von drei Homeoallelen. Dementsprechend würde in Gerste die G144R-Mutation oder ein Knock-out von *Stp13*, den Zuckertransport in die Zellen stark behindern und es wäre mit negativen Effekten für die Pflanze zu rechnen, falls der Zuckertransport nicht weitgehend von redundanten Zuckertransportern übernommen wird. Fraglich bliebe in diesem Fall aber, ob die G144R-Mutation oder ein Knock-out von *Stp13* in Gerste dann überhaupt eine Resistenz vermitteln würde. In der Studie von Milne et al. (2019) konnten in einem *Screening* keine Gersten-Akzessionen mit der G144R-Mutation gefunden werden, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass bei der Vorlage von nur einer *Stp13*-Kopie die G144R-Mutation nicht von Vorteil für die Pflanze ist. Vermutlich würde sowohl in Gerste als auch in Weizen ein vollständiger Knock-out von *Stp13* zu Leistungseinbußen führen, was auch daraus ersichtlich wird, dass in keinen Gersten- und Weizensorten solche Knock-outs zu finden sind. Denkbar wäre, dass die Mutation in einem heterozygoten Status, also mit einem *Stp13*-Wildtypallel und einem *Stp13-G144R*-Allel, der gleiche Resistenz-vermittelnde Effekt wie in Weizen erzeugt werden kann. Dies wurde in heterologen Hefeassays bestätigt und konnte durch das Einbringen des *Lr67res*-Transgens oder des *HvStp13-G144R*-Transgens in Gerste gezeigt werden (Moore et al., 2015; Milne et al., 2019; Skoppek et al., 2021). Damit wäre eine *HvStp13*-basierte Resistenz besonders für die Hybridzüchtung in Gerste interessant. Weitere Experimente müssten jedoch unternommen werden, um herauszufinden, ob HvSTP13 mit anderen Zuckertransportern interagieren kann oder ob andere Zuckertransporter zumindest teilweise die Funktion von STP13 bei einem Knock-out übernehmen können. Zum Beispiel wurde in *Arabidopsis* und *Medicago truncatula* gezeigt, dass STP1 redundant zu STP13 funktioniert (Yamada et al., 2016; Gupta et al., 2021).

4.4. *Lr67*-vermittelter Resistenzmechanismus

Rost- und Mehltäupilze sind biotrophe Pilze, die zum Infektionsbeginn Haustorien in den Pflanzenzellen bilden, die der massiven Aufnahme von Nährstoffen dienen, um den weiteren Befallsverlauf zu ermöglichen. Zudem gibt es Hinweise, dass Haustorien an der Umlenkung von Stoffwechselprozessen und an der Unterdrückung von

Abwehrmechanismen beteiligt sind (Voegelé & Mendgen, 2003). Um zunächst einen Befall zu erkennen und entsprechend reagieren zu können, verfügen Pflanzen über verschiedene Abwehrmechanismen. Dazu gehören sowohl die unspezifische PAMP-vermittelte Immunität (PTI), bei der konservierte PAMPs erkannt werden, als auch die Pathogen-spezifische Effektor-vermittelte Immunität (ETI), bei der pflanzliche Resistenzgene mit pathogenen Avirulenzgenen interagieren (Dodds et al., 2009). Von Getreidemehltau und seinen wirtsartsspezifischen Spezialformen ist bekannt, dass Avirulenzgene sehr divers sind und einige Effektoren direkt mit NLR-Genen der Wirte interagieren. Die Avirulenzgene unterliegen einem hohen Selektionsdruck, der sich aus der Co-Evolution zwischen den Pathogenen und dem Immunsystem der Wirtspflanzen ergibt (Bourras et al., 2018). Jedoch ist bekannt, dass im Gegensatz zu den klassischen NLR-Resistenzgenen, die durch die APR-Gene *Lr34*- und *Lr67*-vermittelte Resistenz nicht auf einer Gen-für-Gen Interaktion mit Avirulenzgenen beruht (Dodds et al., 2009). Somit sind diese Gene zum einen wirksam gegen ein breites Spektrum an Pathogenen und zum anderen können die Pathogene diese Resistenz trotz ihrer hohen genetischen Variabilität nicht so leicht überkommen (Ellis et al., 2014). Der Mechanismus, wie die Resistenz durch *Lr67* vermittelt wird, ist bisher nicht vollständig verstanden. In den folgenden Abschnitten werden zum einen die Beteiligung von STP13 an der PAMP-vermittelten Immunität und zum anderen drei Resistenzmechanismus-Hypothesen diskutiert.

4.4.1. Beteiligung von *Stp13* an der PAMP-vermittelten Immunität

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass *Stp13* an der basalen oder PAMP-vermittelten Immunität beteiligt ist und in Folge dessen eine generelle Immunantwort der Pflanze ausgelöst wird, die die Entwicklung der Pathogene hemmt. Zum einen konnte in *Arabidopsis* gezeigt werden, dass bakterielles Flagellin über die *FLAGELLIN-SENSING 2* (FLS2) Rezeptor-Kinase erkannt wird und diese Kinase wiederum mit der *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*-assoziierten Rezeptor-Kinase 1 (BAK1) interagiert. Daraufhin wird eine Protein-Kinase-Kaskade ausgelöst in dessen Folge STP13 durch Phosphorylierung aktiviert wird (s. Abbildung 10; Yamada et al., 2016). FLS2 und BAK1 sind Bestandteile der PAMP-vermittelten Immunität. Zudem konnte in aktuellen Studien gezeigt werden, dass die *Stp13*-Expression nicht nur in Folge von bakteriellen, sondern auch von pilzlichen PAMPs (z.B. Chitin) hochreguliert wird (Gupta et al., 2021; Skoppek et al., 2021). Auch in Folge einer Infektion mit Rostpilzen wird die Expression sowohl von *Lr67* als auch von *HvStp13* hochreguliert (Moore et al., 2015; Milne et al., 2019; Huai et

al., 2020). Normalerweise würden die haustorienbildenden Rost- und Mehлтаupilze von dem erhöhten Zuckertransport in die Zellen profitieren, da dadurch auch mehr Zucker für ihr Wachstum zur Verfügung steht. So haben Huai et al. (2020) zum Beispiel gezeigt, dass durch Lr67 die cytoplasmatische Hexoseakkumulation erhöht wird, was möglicherweise zur Anfälligkeit von bestimmten Weizensorten für Gelbrost beiträgt. Andere Studien zeigen, dass STP13 ebenfalls an der Abwehr des nekrotrophen Schimmelpilzes *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis* beteiligt ist. Auch hier wird die *Stp13*-Expression in Folge des Pathogenbefalls hochreguliert, jedoch trägt in diesem Fall eine erhöhte STP13-Proteinabundanz zur Resistenz bei. Ein *stp13*-Knock-out führte hingegen zu einer Reduktion des Zuckertransports und erhöhte die Anfälligkeit für *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis* (Lemonnier et al., 2014). Norholm et al. (2006) konnten jedoch zeigen, dass *stp13*-Knock-out Linien nicht anfälliger für den nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* waren.

Es gibt keine Hinweise darauf, dass *Stp13* direkt von den Rostpilzen über Effektoren hochreguliert wird, sondern die Hochregulierung scheint eine Folge der pflanzeigenen Immunabwehr zu sein (Gupta et al., 2021). Milne et al. (2019) haben gezeigt, dass Pathogenese-assoziierte (*Pathogenesis-related*; PR) Gene in *Lr67res*-transgenen Gerstenpflanzen zu Beginn der Infektion mit Braunrost stärker exprimiert werden als in Kontrollpflanzen. Es ist bekannt, dass bei der PAMP-vermittelten Nichtwirts-Resistenz (*Non-host resistance*) allgemeine pathogene Elizitoren auf eine unspezifische Weise erkannt werden und dies führt zu einer erhöhten Expression von PR-Genen, der Produktion von ROS, der Akkumulation von Phytoalexinen und der lokalen Verstärkung der Zellwand sowie letztendlich zu hypersensitiver Reaktion und programmiertem Zelltod (Nürnberg et al., 2005; Serfling et al., 2016). Norholm et al. (2006) vermuten, dass Zuckertransport eine Rolle beim programmierten Zelltod spielt, da sie eine Korrelation mit *Stp13*-Expression zeigen konnten. Ebenso weisen die von Skoppek et al. (2021) gefundenen W-Box-Cluster in der Promotorregion von HvSTP13 auf eine Rolle in der PAMP-vermittelten Immunität hin, da WRKY-Transkriptionsfaktoren Schlüsselfunktionen in den nachgeschalteten Prozessen der PTI haben. HvSTP13 scheint in Folge des PTI-Signalwegs über WRKY-Transkriptionsfaktoren aktiviert zu werden, um dem von den Pathogenen erzeugten *Sink* entgegenzuwirken (Skoppek et al., 2021).

Auch andere Zuckertransporter spielen eine Rolle bei Pflanzen-Pathogen-Interaktionen. So können verschiedene Pathogene, wie z.B. *Xanthomonas*, *Botrytis cinerea* oder *Erysiphe necator*, über Effektoren die Expression von *SWEETs* induzieren und damit die

apoplastische Saccharose-Konzentration und Verfügbarkeit erhöhen (zusammengefasst in Breia et al., 2021). Es wird vermutet, dass STPs als Gegenspieler zu den von Pathogenen induzierten SWEETs fungieren, um den Zucker in Form von Hexosen zu reimportieren (Bezruczyk et al., 2018).

Angenommen, die bisherigen Studien liegen richtig und STP13 ist an der PAMP-vermittelten Immunität beteiligt, bleibt dennoch die Frage offen, wie *Lr67res* die Resistenz gegen Rost- und Mehлтаupilze vermittelt.

4.4.2. Die dominant-negative Interferenz-Hypothese

Eine Hypothese zur Erklärung der Resistenzbildung durch *Lr67res* beruht darauf, dass durch eine dominant-negative Interferenz von *Lr-D67res* mit den anderen *Lr67*-Homeoallelen bei der Bildung von multimeren Proteinkomplexen der Zuckertransport in die Zelle reduziert wird (Moore et al., 2015). Skoppek et al. (2021) konnten zeigen, dass bei einer Braunrost-Infektion von transgener *HvStp13-G144R*-Gerste die anfängliche Kolonisierung bis zu der Bildung von ersten Haustorienmutterzellen auf normale Weise stattfindet. Allerdings verlangsamt sich daraufhin die Entwicklung des Pilzes im Vergleich zur Infektion von Wildtyp-Pflanzen. Wenn die Glukoseversorgung durch STP13-G144R limitiert wird, kann der Pilz sich nicht weiterentwickeln und im Wettlauf mit weiteren aktivierten Resistenzmechanismen der Pflanze nicht bestehen. Diese Störung der fundamentalen Voraussetzungen für die Entwicklung des Pilzes würde auch das breite Spektrum der Resistenz gegen verschiedene biotrophe Pilze erklären (Skoppek et al., 2021).

STP13 ist ein Plasmamembran-lokalisierter Monosaccharid/ H⁺-Symporter und sowohl in Hefeassays als auch mittels BiFC-Assays wurde gezeigt, dass *Lr67* Homooligomere formt, aber wahrscheinlich keine Heterooligomere mit anderen STPs (getestet mit STP6; Moore et al., 2015; Huai et al., 2020). Auch in Gerste und *Medicago truncatula* interagieren STP13-Proteine miteinander und mit dem *Lr67*-Transgen aus Weizen (Gupta et al., 2021; Skoppek et al., 2021). Es ist bekannt, dass Membranproteine vorübergehend oder dauerhaft zu Polymeren assemblieren, um aktiv zu bleiben. Auch für die Aktivität und Regulierung von Zuckertransportern ist die Oligomerisierung wichtig (Cechetti et al., 2019). Zum Beispiel bildet der Glukose Transporter GLUT1, der ebenso wie STP13 zu den MFS-Transportern gehört, in der Membran nicht-kovalente Di- und Tetramere, wobei die neunte Transmembrandomäne entscheidend für die Bildung von Oligomeren ist (Herbert und Carruthers, 1992; De Zutter et al., 2013). Auch ist bekannt, dass eine dominant-

negative Interferenz der Saccharose-Transporter SUT1 und SUT4 zu einer Hemmung der Aktivität des SUT1-Transporters führt (Liesche et al., 2011). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die SWEET1-Transporter Homooligomere bilden und die Oligomerisation mit einem nicht-funktionalen SWEET1-Protein zu einer Reduktion des Zuckertransports führt (Xuan et al., 2013).

Lr67 und *HvStp13* gehören zum hochkonservierten *Stp13-like*-Stamm, der sich von den anderen *Stps* im phylogenetischen Stammbaum unterscheidet (Moore et al., 2015; Huai et al., 2020). Womöglich ist dieser Unterschied eine Erklärung, weswegen STP13 keine Heterodimere mit anderen STP-Proteinen, sondern ausschließlich STP13-Homooligomere formt. In heterologen Hefeassays wurde gezeigt, dass STP13-G144R-Varianten aus verschiedenen Arten keinen Zucker transportieren können (Moore et al., 2015; Milne et al., 2019; Gupta et al., 2021). Außerdem wurde gezeigt, dass der STP13-vermittelte Glukosetransport an den Protonengradienten gekoppelt ist (Nørholm et al., 2006; Moore et al., 2015; Milne et al., 2019; Gupta et al., 2021). Die Aminosäure Asparaginsäure an Position 39 (D39) ist an der Protonenbindung beteiligt und über den Protonierungszustand von D39 wird der Zuckertransport von STPs reguliert (Gupta et al., 2021). Die G144R-Mutation führt zu einer Zunahme an positiver Ladung in der Nähe des Protonen-Donor/Akzeptor-Paares. Außerdem liegt R144 in einer Distanz zu D39, die die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen erlaubt und dies könnte die Umgebung verändern, die wichtig für die Protonierung/Deprotonierung ist. Folglich würde durch die G144R-Mutation die für den Zuckertransport wichtige Konformationsänderung des Proteins beeinträchtigt werden (Gupta et al., 2021). Dies würde erklären, weswegen die Zuckertransportfähigkeit von STP13-G144R reduziert ist.

4.4.3. Die Zuckersignal-Hypothese

Zu der von Moore et al. (2015) aufgestellten dominant-negativen Interferenz-Hypothese gehört auch, dass es durch die *Lr67res*-vermittelte Inhibition des Zuckertransports zu einem erhöhten apoplastischen Hexose/Saccharose-Verhältnis kommt, was wiederum zu einer durch Zuckersignale-vermittelten Abwehrreaktion führt. Die Zuckersignal-Hypothese wurde auch im Kontext dessen diskutiert, dass verschiedene Zucker zelluläre Prozesse auf mehreren Ebenen regulieren können. Zahlreiche Studien belegen eine Erhöhung der Zellwand-Invertase-Aktivität/Expression und der Regulierung von Monosaccharid-Transportern als Antwort auf einen Pathogenbefall (zusammengefasst in Proels und Hückelhoven, 2014). Erhöhte Glukoselevel dienen als Zuckersignal und führen

zu einer Unterdrückung der Expression von Fotosynthese-Genen und einer induzierten Expression von PR-Genen, was zentrale Bestandteile der Pathogenabwehr sind (zusammengefasst in Proels und Hückelhoven, 2014). Skoppek et al. (2021) vermuten, dass die durch STP13-G144R verursachten Änderungen der relativen Glukoseverhältnisse über Rezeptoren, wie zum Beispiel die intrazelluläre Hexokinase 1 oder der extrazelluläre G-Protein-gekoppelten Rezeptor RGS1 (*Regulator of G-protein signalling protein 1*), wahrgenommen werden, die wiederum an der Aktivierung von Abwehrmechanismen beteiligt sind. Mehrere cis-regulatorische Elemente, die an der Zuckerrepression beteiligt sind, wurden in den Promotoregionen von *Stps*, darunter auch *Stp13*, gefunden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression von *Stp13* durch Glukose oder Saccharose negativ bzw. positiv reguliert wird (Cordoba et al., 2015; Gupta et al., 2021). Eine weitere Hypothese, wie durch Zuckersignale Resistenz vermittelt werden könnte, ist das durch Zucker die Expression von pathogenen Typ-III-Sekretionssystemen beeinflusst wird und damit verbunden die Fähigkeit von Pathogenen Effektormoleküle in die Pflanzen einzubringen reguliert wird. Die Zucker-Homöostase im Apoplasma scheint die Virulenz von Pathogenen direkt zu beeinflussen (Bezruczyk et al., 2018).

4.4.4. Gain-of-function-Hypothese

Die sogenannte *Gain-of-function*-Hypothese wurde in mehreren Studien diskutiert (Milne et al., 2019; Gupta et al., 2021; Skoppek et al., 2021). Die G144R-Mutation könnte, wie bereits weiter oben diskutiert, zu einer Umstrukturierung der Bindungstasche führen, was die Bindung eines anderen Substrates möglich machen würde und dieses Substrat könnte eine Immunreaktion auslösen. Diese Hypothese ist aber noch sehr spekulativ und würde auch nicht erklären, wieso das von Huai et al. (2020) gezeigte *Silencing* von *Lr67* zu einer Resistenz gegen Gelbrost führt. Auch die in dieser Arbeit erzeugten *HvStp13*-Mutanten, die in vorläufigen Tests Resistenz gegen Braunrost zeigten, sprechen eher für die Kombination aus einer Reduktion von Glukoseimport und der Aktivierung des Zuckersignalwegs.

4.4.5. Hypothetisches Resistenzmodell

Auf Grundlage der zur Verfügung stehenden Informationen wurde ein hypothetisches Modell zur Resistenzbildung durch *Lr67res* in Weizen erstellt (Abbildung 48). Wenn Rost- oder Mehлтаupilze die Pflanze befallen, werden von der Pflanze pathogene Muster/Elizitoren erkannt und diese lösen eine Abwehrreaktion, die PAMP-vermittelte Immunität, aus. In Zuge dessen wird auch die *Lr67*-Expression und die *Lr67*-Aktivität

über eine Phosphorylierung hochreguliert, was dazu führt, dass mehr Zucker aus dem Apoplasten in die Zellen transportiert wird. Dies soll verhindern, dass im extrazellulären Raum zu viel Zucker für die Pathogene verfügbar ist und diese sich nicht als zusätzliches *Sink*-Organ etablieren können. Rost- und Mehltaupilze sind jedoch haustorienbildende Pilze, die ihre Nährstoffe aus den Zellen beziehen. Wird mehr Zucker in die Zellen transportiert, profitieren diese Pathogene zusätzlich. Außerdem scheint in anfälligen Genotypen die durch die PTI ausgelöste Abwehrreaktion nicht ausreichend zu sein, um der Ausbreitung des Pilzes Einhalt zu gebieten bzw. werden durch den vermehrten Zuckertransport in die Zellen besonders günstige Wachstumsbedingungen für diese speziellen Pathogene geschaffen. Erst wenn das Resistenz-vermittelnde *Lr-D67res*-Allel (*Lr67res*) ins Spiel kommt, wird zwar die *Lr67*-Expression hochreguliert, aber durch die putative dominant-negative Interferenz von *Lr67res* mit anderen *Lr67*-Proteinen wird der Zuckertransport beeinträchtigt (Abbildung 48B). Dadurch haben die Rost- und Mehltaupilze unzureichenden Zugang zu Nährstoffen, um sich weiterzuentwickeln. Zusätzlich wird von der Pflanze das veränderte Zuckerverhältnis (Hexose/Saccharose) über noch unbekannte Zuckerrezeptoren (intrazellulär oder extrazellulär) wahrgenommen, was wiederum zum Auslösen einer Zuckersignalkette und entsprechenden Abwehrreaktionen führt.

In diesem Modell gibt es noch einige Fragezeichen, weil viele der Signalwege noch nicht bekannt sind oder bestimmte Mechanismen noch nicht belegt sind. In dieser Arbeit wurden sowohl in Gerste als auch in Weizen verschiedene Knock-out- und In-frame-Mutationen (z.B. 3 bis 114 bp-Deletionen) erzeugt, die bei weiterer Analyse aufschlussreiche Einblicke in den *Lr67/Stp13*-vermittelten Resistenzmechanismus geben werden.

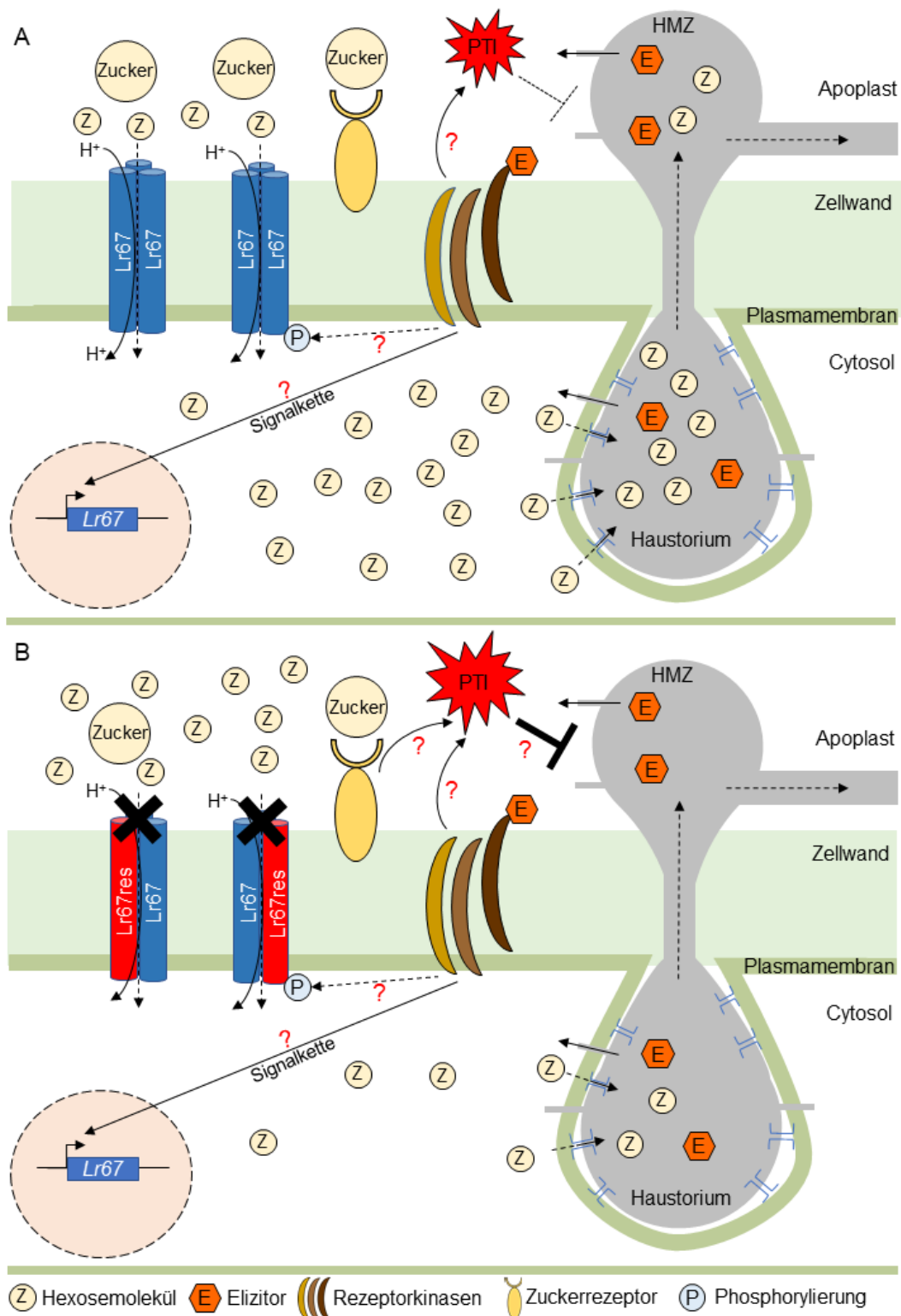


Abbildung 48: *Lr67*-vermittelter Resistenzmechanismus Rost und Mehltaupilze bilden Haustorien um Nährstoffe aus der Pflanzenzelle zu beziehen. (A) Pathogene Elizitoren werden von speziellen Rezeptoren und Rezeptorkinasen erkannt und die PAMP-vermittelte Immunität (PTI) wird ausgelöst. Daraufhin wird die *Lr67*-Expression hochreguliert und *Lr67*-Proteine durch Phosphorylierung aktiviert. Apoplastische Saccharose wird durch die Zellwand-Invertase zu Hexosen (Glukose und Fruktose) gespalten, um mittels *Lr67* in die Zellen transportiert zu werden. In anfälligen Genotypen ist die PTI nicht ausreichend, um das Pilzwachstum zu stoppen. (B) *Lr67res* bildet inaktive Oligomere mit anderen *Lr67*-Proteinen und weniger Hexose wird in die Zellen transportiert. Der Pilz bekommt nicht genügend Nährstoffe und kann sich nicht weiter ausbreiten. Das veränderte Zuckerverhältnis (Hexose/Saccharose) wird von Zuckerrezeptoren wahrgenommen und eine Zuckersignalkette führt zu einer Abwehrreaktion.

4.5. Relevanz von *Lr67/ Stp13* für die Pflanzenzüchtung

In den letzten Jahrzehnten kam es global immer häufiger zu Ausbrüchen von neuen Rostisolaten, die zu dramatischen Auswirkungen auf die Getreideernten führten, wenn die Pflanzen nicht hinreichend mit Fungiziden behandelt wurden oder über keine wirksamen Resistenzmechanismen verfügten. Von besonderer Bedeutung waren dabei Ausbrüche der Schwarzrost-Rasse Ug99, die erstmals in Uganda aufgetreten ist und sich von dort in Afrika und darüber hinaus verbreitet hat. Während aktuelle Sorten, beispielsweise in Europa, über immer bessere Resistenzeigenschaften gegen Braun- und Gelbrost verfügen, gibt es derzeit im Zuchtmaterial keinerlei Resistenzen gegen Schwarzrost. Mit dem Klimawandel und immer wärmeren Wintern ist jedoch auch in Europa mit einer steigenden Gefahr von Schwarzrostausbüchen zu rechnen (Bhattacharya, 2017). Im Anbetracht der politischen Ziele zur Reduktion des Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln, kommt der Resistenzzüchtung hier also eine wachsende Bedeutung zu.

Die meisten der Rost-Resistenzgene vermitteln eine Keimlings-Resistenz oder rassenspezifische Resistenzen, die auf einer direkten Gen-für-Gen Interaktion mit *NLR*-Genen beruhen und leicht von den Pathogenen überwunden werden können (Bolton et al., 2008). Für einen dauerhaften Schutz ist eine wie durch *Lr67*-vermittelte APR oder rassenspezifische Resistenz vorteilhaft, da zum einen ein geringerer Selektionsdruck auf das Pathogen ausgeübt wird und zum anderen die Resistenz nur evolutionär aufwendiger überwunden werden kann. Von den über 100 bekannten Braunrost-Resistenzgenen, werden 15 einer Resistenz im adulten Stadium (APR) zugeschrieben (Singla et al., 2017; Atia et al., 2021). Molekulare Marker erleichtern das identifizieren solcher APR-Gene im Zuchtmaterial und das Selektieren während der Kreuzungszucht beim Kombinieren der Gene (Singla et al., 2017). Die Identifizierung und Klonierung der APR-Gene *Lr34* (Krattinger et al., 2009) und *Lr67* (Moore et al., 2015) war die Basis für die Marker-gestützte Selektion dieser Gene und erleichtert den Einsatz dieser Resistenzgene in Zuchtprogrammen. In Weizen, Gerste und *Medicago truncatula* wurde gezeigt, dass das Einbringen des *Lr67-G144R*-Transgens oder des entsprechenden artspezifischen *Stp13-G144R*-Transgens zu Resistenzen gegen Rost- und Mehltäupilze führte (Moore et al., 2015; Milne et al., 2019; Huai et al., 2020; Gupta et al., 2021; Skoppek et al., 2021). Demnach stellt *Lr67/ Stp13* eine wertvolle Resistenzquelle gegen die genannten Pilze in einer Vielzahl von Pflanzenarten dar. Jedoch handelt es sich dabei um eine partielle Resistenz, die bei schweren Epidemien allein keinen ausreichenden Schutz

bietet (Luo et al., 2021). Das Kombinieren von zwei oder mehreren APR-Genen kann allerdings zu nahezu immunen Phänotypen führen (Singla et al., 2017). Ebenso wurde gezeigt, dass das Kombinieren von vier NLR-Genen (*Sr22*, *Sr35*, *Sr45* und *Sr50*) mit *Lr67* in einem multiplen Transgen-Ansatz zu einer wirksamen Resistenz gegen Schwarzrost (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in Weizen führte (Luo et al., 2021). Der Einsatz von APR-Genen wie *Lr67* kann den Pflanzen einen guten Grundschutz bieten, da diese partielle Resistenz dauerhaft und gegen verschiedene Pathogene wirksam ist. In Kombination mit anderen Resistenzmechanismen, die derzeit schon vielfach in der Züchtung genutzt werden, können so nachhaltig rostresistente Sorten gezüchtet werden.

Mit Methoden der klassischen Züchtung wie Kreuzung und markergestützte Selektion ist *Lr67res* jedoch nur schwer in aktuelles Zuchtmaterial integrierbar. Durch die enge Kopplung von *Lr67* mit *Rht-D1* ist das Einkreuzen des gewollten Resistenz-vermittelnden *Lr67res*-Allels unter Beibehaltung der Kurzstrohigkeit kaum möglich. Deshalb würde der Einsatz von Zielsequenz-spezifischen Endonukleasen den Züchtungsprozess im Falle von *Lr67* besonders erleichtern und beschleunigen, da das mit der Kreuzung verbundene Problem der Genkopplung (*Linkage drag*) vermieden wird und sich so auch mehrere APR-Resistenzgene schneller und einfacher kombinieren lassen. In dieser Arbeit wurden mittels gRNA/Cas9-Technologie verschiedene *Lr67*-Mutanten erzeugt. In wieweit die erzeugten Mutationen Resistenzen vermitteln, kann erst anhand der nächsten Generationen und damit erfolgenden Resistenztests bestätigt werden.

4.6. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das modulare Vektorsystem CasCADE entwickelt und anhand der Mutagenese von *Lr67/Stp13* validiert mit dem langfristigen Ziel eine *Lr67*-vermittelte Resistenz in Weizen und Gerste zu etablieren.

Das bestehende CasCADE-System umfasst zahlreiche, funktionale Module zur flexiblen Genomeditierung von Nutzpflanzen mit verschiedenen Ansätzen. Auf neue Entwicklungen im dynamischen Forschungsgebiet der Cas-Endonukleasen kann aufgrund der Flexibilität der einzelnen Module schnell mit Erweiterungen des Systems reagiert werden. Beispielsweise können weitere artifizielle Cas9-Varianten oder Cas-Endonukleasen aus anderen Organismen leicht in das Vektorsystem eingebunden werden. Eine weitere Möglichkeit zur Erweiterung des Vektorsystems bestünde darin, die Anzahl der zu exprimierenden gRNAs von derzeit vier auf acht oder 12 gRNAs zu erhöhen. Dies kann von Vorteil sein, wenn mehrere Gene gleichzeitig modifiziert oder z.B.

Promotoren systematisch diversifiziert werden sollen. Des Weiteren können auch alternative gRNA-Expressionssysteme bei Bedarf in das bestehende Vektorsystem integriert werden, genauso wie Reparaturvorlagen oder -fragmente für die präzise Genomeditierung. In Zukunft wird die methodische Weiterentwicklung präziser Ansätze der Genomeditierung eine zunehmende Rolle spielen. Dabei muss berücksichtigt werden, wie die Reparaturvorlage in ausreichenden Mengen in die Pflanzen gelangt bzw. dort zur Verfügung gestellt wird. Ein Ansatz ist zum Beispiel der Einsatz von selbst-replizierenden Geminivirus-Replikons für die transiente Expression der Reparaturvorlage oder gleich der gesamten gRNA/Cas9-Kassette (Baltes et al., 2014). Die Funktionalität solcher Systeme wurde in transienten Experimenten unter anderem in Weizen gezeigt, allerdings war erst vor kurzem in Studien die präzise Genomeditierung in stabil-transformierten Gerstenpflanzen mit Geminivirus-Replikons fehlgeschlagen (Gil-Humanes et al., 2017; Lawrenson et al., 2021). Für die verlässliche Anwendung von präzisen Genomeditierungsanwendungen in Getreidepflanzen bedarf es in jedem Fall weiterer Forschung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden insgesamt 50 Primärmutanten von *Lr67* in Weizen und 79 Primärmutanten von *HvStp13* in Gerste erzeugt. Die Mutationen in den *Lr67*/*Stp13*-Genen reichten von 3-bp-Insertionen, über Deletionen einzelner Nukleotide bis hin zu großen Deletionen von über 100 bp. Sowohl in Gerste als auch in Weizen wurden die in der T₀-Generation detektierten Mutationen konsequent in die nächste Generation vererbt. Allerdings waren die analysierten Weizenpflanzen in der T₁-Generation grundsätzlich noch in einem heterozygoten oder chimären Zustand, weswegen mit diesen Pflanzen noch keine Resistenztests oder weitere Analysen gemacht werden konnten. Im Gegensatz dazu waren bereits einige Gerstenpflanzen in den T₀- und T₁-Generationen homozygot mutiert. Daher konnten mit ausgewählten Mutanten der T₁-Generation erste Resistenztests durchgeführt werden. Dabei stellte sich heraus, dass eine Mutante sowohl im juvenilen als auch im adulten Stadium resistent war und drei weitere Mutanten im adulten Stadium eine Resistenz gegen Braunrost zeigten. Generell können die in dieser Arbeit erzeugten Mutanten bei weiterer Analyse wichtige Einblicke in den noch nicht vollständig verstandenen *Lr67*-Resistenzmechanismus geben. In heterologen Hefeassays könnten zunächst die Transportkapazitäten der verschiedenen Mutationsvarianten ermittelt werden, um zu sehen welche der erzeugten Mutationen zu einem Verlust der Transportaktivität führt. Des Weiteren wäre zu testen, ob *Lr67* und *HvSTP13* mit anderen

Zuckertransportproteinen interagieren und ob die putative Oligomerisierung durch die Mutationen gestört wird. In Pflanzenzellen kann zudem die Oligomerisierung und die Lokalisierung der mutierten STP13-Varianten durch BiFC-Assays und dem taggen mit einem Reporter gen untersucht werden.

Ein weiterer Ansatz ist die gezielte Mutagenese von Signalmolekül-Bindestellen in der Promotorregion von *Lr67/Stp13*. Die Expression von *Lr67/Stp13* wird unter anderem in Folge einer Infektion mit Rostpilzen um ein Vielfaches erhöht und durch die Veränderung von z.B. Transkriptionsfaktor-Bindestellen könnte verhindert werden, dass *Lr67/Stp13* hochreguliert wird. Skoppek et al. (2021) haben bereits gezeigt, dass mehrere cis-regulatorische Elemente in der Promotorregion von *HvStp13* existieren und anhand verfügbarer online-Plattformen könnten solche auch in der Promotorregion von *Lr67* detektiert werden. Expressionsanalysen würden Aufschluss darüber geben, ob es Unterschiede in der Expression zwischen dem Wildtyp *Lr67*-Gen und den mutierten *Lr67*-Genen gibt und Resistenztest würden zeigen, ob Veränderungen in der Promotorregion ebenfalls Resistenz-vermittelnd sind. Einen ähnlichen Ansatz könnte man mit der gezielten Mutagenese des Threonins an der Position 485 verfolgen. Für *Stp13* aus *Arabidopsis* wurde ermittelt, dass dieses Threonin phosphoryliert wird, was zur Erhöhung der Transporteraktivität des Proteins führt (Yamada et al., 2016). Durch Wegfall dieses Threonins in den *Stp13*-Orthologen in Gerste und Weizen könnte Resistenz erzielt werden, da es dann vermutlich nicht zu einer Aktivitätserhöhung von STP13 kommt und der reduzierte Zuckertransport die Entwicklung des Pathogens verlangsamen könnte. Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die präzise Veränderung der Aminosäure Glycin an Position 144, um den ursprünglich in ostasiatischen Weizenlandrassen gefundenen G144R-verursachenden und auf dominante Weise Resistenz-vermittelnden SNP nachzustellen. Dies könnte zum einen mit den im CasCADE-System zur Verfügung stehenden Baseneditoren erreicht werden. Zum anderen wäre eine präzise Veränderung mittels einer Reparaturvorlage denkbar, was jedoch auf Grund des aktuellen Forschungsstands noch nicht effizient umsetzbar ist.

Zusammengefasst wurde das CasCADE-System anhand der Generierung zahlreicher verschiedener *Lr67/Stp13*-Mutanten in Weizen und Gerste erfolgreich validiert. Die erzeugten Mutanten bieten eine gute Ausgangslage für zukünftige weitere Analysen. Zudem gibt es einige Ideen, mit welchen Ansätzen *Lr67/Stp13* gezielt verändert bzw. die Aktivität von STP13 beeinflusst werden kann.

5. Literaturverzeichnis

- Anzalone, A.V., Koblan, L.W., and Liu, D.R. (2020). Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology* 38, 824–844.
- Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A., and Liu, D.R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157.
- Ata, H., Ekstrom, T.L., Martínez-Gálvez, G., Mann, C.M., Dvornikov, A.V., Schaeffbauer, K.J., Ma, A.C., Dobbs, D., Clark, K.J., and Ekker, S.C. (2018). Robust activation of microhomology-mediated end joining for precision gene editing applications. *PLoS Genetics* 14, e1007652.
- Atia, M.A.M., El-Khateeb, E.A., Abd El-Maksoud, R.M., Abou-Zeid, M.A., Salah, A., and Abdel-Hamid, A.M.E. (2021). Mining of leaf rust resistance genes content in Egyptian bread wheat collection. *Plants* 10, 1378.
- Baltes, N.J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P.A., and Voytas, D.F. (2014). DNA replicons for plant genome engineering. *The Plant Cell* 26, 151–163.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., and Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 9, 39.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62, 293–300.
- Bertoni, C. (2014). Emerging gene editing strategies for Duchenne muscular dystrophy targeting stem cells. *Frontiers in Physiology* 5, 148.
- Beyene, G., Buenrostro-Nava, M.T., Damaj, M.B., Gao, S.-J., Molina, J., and Mirkov, T.E. (2011). Unprecedented enhancement of transient gene expression from minimal cassettes using a double terminator. *Plant Cell Reports* 30, 13–25.
- Bezruczyk, M., Yang, J., Eom, J.-S., Prior, M., Sosso, D., Hartwig, T., Szurek, B., Oliva, R., Vera-Cruz, C., White, F.F., Yang, B., and Frommer, W.B. (2018). Sugar flux and signaling in plant-microbe interactions. *The Plant Journal* 93, 675–685.
- Bhargava, R., Onyango, D.O., and Stark, J.M. (2016). Regulation of single-strand annealing and its role in genome maintenance. *Trends in Genetics* 32, 566–575.
- Bhattacharya, S. (2017). Deadly new wheat disease threatens Europe's crops. *Nature* 542, 145-146.
- Blake, V.C., Woodhouse, M.R., Lazo, G.R., Odell, S.G., Wight, C.P., Tinker, N.A., Wang, Y., Gu, Y.Q., Birkett, C.L., Jannink, J.-L., Matthews, D.E., Hane, D.L., Michel, S.L., Yao, E., and Sen, T.Z. (2019). GrainGenes: centralized small grain resources and digital platform for geneticists and breeders. Database, baz065.

- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509–1512.
- Bolton, M.D., Kolmer, J.A., and Garvin, D.F. (2008). Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology* 9, 563–575.
- Bourras, S., Praz, C.R., Spanu, P.D., and Keller, B. (2018). Cereal powdery mildew effectors: a complex toolbox for an obligate pathogen. *Current Opinion in Microbiology* 46, 26–33.
- Breia, R., Conde, A., Badim, H., Fortes, A.M., Gerós, H., and Granell, A. (2021). Plant SWEETs: from sugar transport to plant-pathogen interaction and more unexpected physiological roles. *Plant Physiology* 186, 836–852.
- Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G.L.A., D'Amore, R., Allen, A.M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Huo, N., Luo, M.-C., Sehgal, S., Gill, B., Kianian, S., Anderson, O., Kersey, P., Dvorak, J., McCombie, W.R., Hall, A., Mayer, K.F.X., Edwards, K.J., Bevan, M.W., and Hall, N. (2012). Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491, 705–710.
- Britt, A.B. (2004). Repair of DNA damage induced by solar UV. *Photosynthesis Research* 81, 105–112.
- Brown, W.M., Hill, J.P., and Velasco, V.R. (2001). Barley yellow rust in North America. *Annual Review of Phytopathology* 39, 367–384.
- Budhagatapalli, N., Schedel, S., Gurushidze, M., Pencs, S., Hiekel, S., Rutten, T., Kusch, S., Morbitzer, R., Lahaye, T., Panstruga, R., Kumlehn, J., and Hensel, G. (2016). A simple test for the cleavage activity of customized endonucleases in plants. *Plant Methods* 12, 18.
- Büttner, M. (2010). The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant Biology* 12, 35–41.
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016). Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends in Cell Biology* 26, 52–64.
- Cecchetti, C., Pyle, E., and Byrne, B. (2019). Transporter oligomerisation: roles in structure and function. *Biochemical Society Transactions* 47, 433–440.
- Čermák, T., Curtin, S.J., Gil-Humanes, J., Čegan, R., Kono, T.J.Y., Konečná, E., Belanto, J.J., Starker, C.G., Mathre, J.W., Greenstein, R.L., and Voytas, D.F. (2017). A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *The Plant Cell* 29, 1196–1217.
- Chen, W., Wellings, C., Chen, X., Kang, Z., and Liu, T. (2014). Wheat stripe (yellow) rust caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant Pathology* 15, 433–446.
- Chen, B., Gilbert, L.A., Cimini, B.A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.-W., Park, J., Blackburn, E.H., Weissman, J.S., Qi, L.S., and Huang, B. (2013). Dynamic imaging of

- genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 155, 1479–1491.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186, 757–761.
- Cordoba, E., Aceves-Zamudio, D.L., Hernández-Bernal, A.F., Ramos-Vega, M., and León, P. (2015). Sugar regulation of *SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (STP1)* expression in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 66, 147–159.
- Cowger, C., Miranda, L., Griffey, C., Hall, M., Murphy, J.P., and Maxwell, J.J. (2012). Wheat powdery mildew. In *Disease Resistance in Wheat* (CBA International), 84–119.
- Davies, B., Baulcombe, D., Crute, I., Dunwell, J., Gale, M., Jones, J., Pretty, J., Sutherland, W., and Toulmin, C. (2009). Reaping the benefits: Science and the sustainable intensification of global agriculture. Royal Society, London.
- Dean, R., van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G.D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 414–430.
- Dodds, P.N., and Lagudah, E.S. (2016). Starving the enemy. *Science* 354, 1377–1378.
- Dodds, P.N., Rafiqi, M., Gan, P.H.P., Hardham, A.R., Jones, D.A., and Ellis, J.G. (2009). Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *The New Phytologist* 183, 993–1000.
- Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H.W., Listgarten, J., and Root, D.E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology* 34, 184–191.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
- Dusek, J., Plchova, H., Cerovska, N., Poborilova, Z., Navratil, O., Kratochvilova, K., Gunter, C., Jacobs, R., Hitzeroth, I.I., Rybicki, E.P., and Moravec, T. (2020). Extended set of GoldenBraid compatible vectors for fast assembly of multigenic constructs and their use to create geminiviral expression vectors. *Frontiers in Plant Science* 11, 522059.
- Duveiller, E., Singh, R.P., and Nicol, J.M. (2007). The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. *Euphytica* 157, 417–430.
- Ellis, J.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., and Dodds, P.N. (2014). The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in Plant Science* 5, 641.

- Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLOS ONE* 3, e3647.
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2009). Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLOS ONE* 4, e5553.
- Eom, J.-S., Chen, L.-Q., Sosso, D., Julius, B.T., Lin, I.W., Qu, X.-Q., Braun, D.M., and Frommer, W.B. (2015). SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology* 25, 53–62.
- Fang, Y.-D., Akula, C., and Altpeter, F. (2002). *Agrobacterium*-mediated barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA α barley genomic DNA junctions. *Journal of Plant Physiology* 159, 1131–1138.
- Fausser, F., Schimpl, S., and Puchta, H. (2014). Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 79, 348–359.
- Figuerola, M., Upadhyaya, N.M., Sperschneider, J., Park, R.F., Szabo, L.J., Steffenson, B., Ellis, J.G., and Dodds, P.N. (2016). Changing the game: Using integrative genomics to probe virulence mechanisms of the stem rust pathogen *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Frontiers in Plant Science* 7, 205.
- Franckowiak, J.D. and Lundqvist, U. (2010). Rules for nomenclature and gene symbolization in barley. *Barley Genetics Newsletter* 40, 178-182
- Fu, D., Uauy, C., Distelfeld, A., Blechl, A., Epstein, L., Chen, X., Sela, H., Fahima, T., and Dubcovsky, J. (2009). A *kinase-START* gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323, 1357–1360.
- Gao, Z., Harwig, A., Berkhout, B., and Herrera-Carrillo, E. (2017). Mutation of nucleotides around the +1 position of type 3 polymerase III promoters: The effect on transcriptional activity and start site usage. *Transcription* 8, 275–287.
- Gao, H., Smith, J., Yang, M., Jones, S., Djukanovic, V., Nicholson, M.G., West, A., Bidney, D., Falco, S.C., Jantz, D., and Lyznik, L.A. (2010). Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *The Plant Journal* 61, 176–187.
- Garfinkel, D.J., and Nester, E.W. (1980). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *Journal of Bacteriology* 144, 732–743.
- Garnica, D.P., Nemri, A., Upadhyaya, N.M., Rathjen, J.P., and Dodds, P.N. (2014). The ins and outs of rust haustoria. *PLOS Pathogens* 10, e1004329.
- Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., and Liu, D.R. (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464–471.
- Gerasimova, S.V., Korotkova, A.M., Hertig, C., Hiekel, S., Hofe, R., Budhagatapalli, N., Otto, I., Hensel, G., Shumny, V.K., Kochetov, A.V., Kumlehn, J., and Khlestkina, E.K.

- (2019). Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 22, 1033–1039.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 6, 343–345.
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., Lim, W.A., Weissman, J.S., and Qi, L.S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442–451.
- Gil-Humanes, J., Wang, Y., Liang, Z., Shan, Q., Ozuna, C.V., Sánchez-León, S., Baltes, N.J., Starker, C., Barro, F., Gao, C., and Voytas, D.F. (2017). High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *The Plant Journal* 89, 1251–1262.
- Goyeau, H., Halkett, F., Zapater, M.-F., Carlier, J., and Lannou, C. (2007). Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Fungal Genetics and Biology* 44, 474–483.
- Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neuböck, R., and Hofacker, I.L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research* 36, W70-74.
- Gupta, M., Dubey, S., Jain, D., and Chandran, D. (2021). The *Medicago truncatula* Sugar Transport Protein 13 and its Lr67res-like variant confer powdery mildew resistance in legumes via defense modulation. *Plant and Cell Physiology* 62, 650–667.
- Hacquard, S., Kracher, B., Maekawa, T., Vernaldi, S., Schulze-Lefert, P., and van Loren Themaat, E.v. (2013). Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *PNAS* 110, E2219-2228.
- Hahn, F., Korolev, A., Sanjurjo Loures, L., and Nekrasov, V. (2020). A modular cloning toolkit for genome editing in plants. *BMC Plant Biology* 20, 179.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557–580.
- Hayes, M.A., Feechan, A., and Dry, I.B. (2010). Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology* 153, 211–221.
- Hebert, D.N., and Carruthers, A. (1992). Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. Reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1. *Journal of Biological Chemistry* 267, 23829–23838.

- Hensel, G., Kastner, C., Oleszczuk, S., Riechen, J., and Kumlehn, J. (2009). *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. *International Journal of Plant Genomics* 2009, 835608.
- Herrera-Foessel, S.A., Lagudah, E.S., Huerta-Espino, J., Hayden, M.J., Bariana, H.S., Singh, D., and Singh, R.P. (2011). New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked. *Theoretical and Applied Genetics* 122, 239–249.
- Herrera-Foessel, S.A., Singh, R.P., Lillemo, M., Huerta-Espino, J., Bhavani, S., Singh, S., Lan, C., Calvo-Salazar, V., and Lagudah, E.S. (2014). *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 127, 781–789.
- Hovmøller, M.S., Sørensen, C.K., Walter, S., and Justesen, A.F. (2011). Diversity of *Puccinia striiformis* on cereals and grasses. *Annual Review of Phytopathology* 49, 197–217.
- Howells, R.M., Craze, M., Bowden, S., and Wallington, E.J. (2018). Efficient generation of stable, heritable gene edits in wheat using CRISPR/Cas9. *BMC Plant Biology* 18, 215.
- Hu, J.H., Miller, S.M., Geurts, M.H., Tang, W., Chen, L., Sun, N., Zeina, C.M., Gao, X., Rees, H.A., Lin, Z., and Liu, D.R. (2018). Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* 556, 57–63.
- Huai, B., Yang, Q., Wei, X., Pan, Q., Kang, Z., and Liu, J. (2020). *TaSTP13* contributes to wheat susceptibility to stripe rust possibly by increasing cytoplasmic hexose concentration. *BMC Plant Biology* 20, 49.
- Hulbert, S., and Pumphrey, M. (2014). A time for more booms and fewer busts? Unraveling cereal-rust interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 207–214.
- Huo, N., Gu, Y., McCue, K.F., Alabed, D., and Thomson, J.G. (2019). Complete genome sequence of *Agrobacterium fabrum* strain 1D159. *Microbiology Resource Announcements* 8.
- IPBES (2019). Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services. The Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services.
- IPCC (2018). Global warming of 1.5°C. The Intergovernmental Panel on Climate Change.
- IPCC (2021). Climate change 2021: The physical science basis. The Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Ishii, T., Schubert, V., Khosravi, S., Dreissig, S., Metje-Sprink, J., Sprink, T., Fuchs, J., Meister, A., and Houben, A. (2019). RNA-guided endonuclease - in situ labelling (RGEN-ISL): a fast CRISPR/Cas9-based method to label genomic sequences in various species. *The New Phytologist* 222, 1652–1661.

- Ismagul, A., Iskakova, G., Harris, J.C., and Eliby, S. (2014). Biolistic transformation of wheat with centrophenoxine as a synthetic auxin. *Methods in Molecular Biology* 1145, 191–202.
- Ivandic, V., Walther, U., and Graner, A. (1998). Molecular mapping of a new gene in wild barley conferring complete resistance to leaf rust (*Puccinia hordei* Otth). *Theoretical and Applied Genetics* 97, 1235–1239.
- Jin, Y., Szabo, L.J., and Carson, M. (2010). Century-old mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of *Berberis* as an alternate host. *Phytopathology* 100, 432–435.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., and Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* 2, e00471.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Jørgensen, J.H., and Wolfe, M. (1994). Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13, 97–119.
- Kim, Y.G., Cha, J., and Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *PNAS* 93, 1156–1160.
- Knight, T. (2003). Idempotent vector design for standard assembly of Biobricks. MIT Artificial Intelligence Laboratory.
- Koeppel, I., Hertig, C., Hoffie, R., and Kumlehn, J. (2019). Cas endonuclease technology-A quantum leap in the advancement of barley and wheat genetic engineering. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2647.
- Kolmer, J. (2013). Leaf rust of wheat: Pathogen biology, variation and host resistance. *Forests* 4, 70–84.
- Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420–424.
- König, J., Kopahnke, D., Steffenson, B.J., Przulj, N., Romeis, T., Röder, M.S., Ordon, F., and Perovic, D. (2012). Genetic mapping of a leaf rust resistance gene in the former Yugoslavian barley landrace MBR1012. *Molecular Breeding* 30, 1253–1264.
- Kouranova, E., Forbes, K., Zhao, G., Warren, J., Bartels, A., Wu, Y., and Cui, X. (2016). CRISPRs for optimal targeting: Delivery of CRISPR components as DNA, RNA, and protein into cultured cells and single-cell embryos. *Human Gene Therapy* 27, 464–475.
- Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L., and Keller, B. (2009). A putative ABC transporter

- confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323, 1360–1363.
- Kumar, N., Galli, M., Ordon, J., Stuttmann, J., Kogel, K.-H., and Imani, J. (2018). Further analysis of barley *MORC1* using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system. *Plant Biotechnology Journal* 16, 1892–1903.
- Kumlehn, J., and Hensel, G. (2009). Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breeding Science* 59, 553–560.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D., and Loerz, H. (2006). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal* 4, 251–261.
- Kumlehn, J., Pietralla, J., Hensel, G., Pacher, M., and Puchta, H. (2018). The CRISPR/Cas revolution continues: From efficient gene editing for crop breeding to plant synthetic biology. *Journal of Integrative Plant Biology* 60, 1127–1153.
- Lagudah, E.S. (2011). Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat. *Euphytica* 179, 81–91.
- Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., Shams, M., Abrouk, D., Lavire, C., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Guéguen, L., Daubin, V., Muller, D., and Nesme, X. (2011). Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biology and Evolution* 3, 762–781.
- Lawrenson, T., Hinchliffe, A., Clarke, M., Morgan, Y., and Harwood, W. (2021). In-plant gene targeting in barley using Cas9 with and without geminiviral replicons. *Frontiers in Genome Editing* 3, 663380.
- Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Østergaard, L., Patron, N., Uauy, C., and Harwood, W. (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biology* 16, 258.
- Lemonnier, P., Gaillard, C., Veillet, F., Verbeke, J., Lemoine, R., Coutos-Thévenot, P., and La Camera, S. (2014). Expression of *Arabidopsis* sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Molecular Biology* 85, 473–484.
- Leonard, K.J., and Szabo, L.J. (2005). Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Pathology* 6, 99–111.
- Levine, M.N., and Cherewick, W.J. (1952). Studies on dwarf leaf rust of barley. *Technical Bulletins* 156508.
- Li, C., Zong, Y., Wang, Y., Jin, S., Zhang, D., Song, Q., Zhang, R., and Gao, C. (2018). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biology* 19, 59.

- Liang, F., Han, M., Romanienko, P.J., and Jasin, M. (1998). Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *PNAS* 95, 5172–5177.
- Liang, G., Zhang, H., Lou, D., and Yu, D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific Reports* 6, 21451.
- Liesche, J., Krügel, U., He, H., Chincinska, I., Hackel, A., and Kühn, C. (2011). Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *Journal of Plant Physiology* 168, 1426–1433.
- Lowder, L.G., Zhang, D., Baltus, N.J., Paul, J.W., Tang, X., Zheng, X., Voytas, D.F., Hsieh, T.-F., Zhang, Y., and Qi, Y. (2015). A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiology* 169, 971–985.
- Luo, M., Xie, L., Chakraborty, S., Wang, A., Matny, O., Jugovich, M., Kolmer, J.A., Richardson, T., Bhatt, D., Hoque, M., Patpour, M., Sørensen, C., Ortiz, D., Dodds, P., Steuernagel, B., Wulff, B.B.H., Upadhyaya, N.M., Mago, R., Periyannan, S., Lagudah, E., Freedman, R., Lynne Reuber, T., Steffenson, B.J., and Ayliffe, M. (2021). A five-transgene cassette confers broad-spectrum resistance to a fungal rust pathogen in wheat. *Nature Biotechnology* 39, 561–566.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Y., Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z., and Liu, Y.-G. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant* 8, 1274–1284.
- Manova, V., and Gruszka, D. (2015). DNA damage and repair in plants - from models to crops. *Frontiers in Plant Science* 6, 885.
- Marasas, C.N., Smale, M., and Singh, R.P. (2004). The economic impact in developing countries of leaf rust resistance breeding in CIMMYT-related spring bread wheat. *CIMMYT Economics Program Paper* 04-01.
- Marthe, C., Kumlehn, J., and Hensel, G. (2015). Barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using immature embryos. *Methods in Molecular Biology* 1223, 71–83.
- Mascher, M., Gundlach, H., Himmelbach, A., Beier, S., Twardziok, S.O., Wicker, T., Radchuk, V., Dockter, C., Hedley, P.E., Russell, J., Bayer, M., Ramsay, L., Liu, H., Haberer, G., Zhang, X.-Q., Zhang, Q., Barrero, R.A., Li, L., Taudien, S., Groth, M., Felder, M., Hastie, A., Šimková, H., Staňková, H., Vrána, J., Chan, S., Muñoz-Amatriaín, M., Ounit, R., Wanamaker, S., Bolser, D., Colmsee, C., Schmutzer, T., Aliyeva-Schnorr, L., Grasso, S., Tanskanen, J., Chailyan, A., Sampath, D., Heavens, D., Clissold, L., Cao, S., Chapman, B., Dai, F., Han, Y., Li, H., Li, X., Lin, C., McCooke, J.K., Tan, C., Wang, P., Wang, S., Yin, S., Zhou, G., Poland, J.A., Bellgard, M.I., Borisjuk, L., Houben, A., Doležel, J., Ayling, S., Lonardi, S., Kersey, P., Langridge, P., Muehlbauer, G.J., Clark, M.D., Caccamo, M., Schulman, A.H., Mayer, K.F.X., Platzer, M., Close, T.J., Scholz, U., Hansson, M., Zhang, G., Braumann, I., Spannagl, M., Li, C., Waugh, R., and Stein, N. (2017). A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544, 427–433.

- Mayer, K.F.X., Waugh, R., Brown, J.W.S., Schulman, A., Langridge, P., Platzer, M., Fincher, G.B., Muehlbauer, G.J., Sato, K., Close, T.J., Wise, R.P., and Stein, N. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491, 711–716.
- McDonald, B.A., and Linde, C. (2002). The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124, 163–180.
- McIntosh, R.A., Wellings, C.R., and Park, R.F. (1995). Wheat rusts: An atlas of resistance genes. *Australasian Plant Pathology* 25, 70.
- McIntosh, R.A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Appels, R., and Xia, X.C. (2013) Catalogue of gene symbols for wheat. KOMUGI Integrated Wheat Science Database.
- Meinke, D., and Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *The Plant Journal* 12, 247–253.
- Milgroom, M.G. (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* 34, 457–477.
- Milne, R.J., Dibley, K.E., Schnippenkoetter, W., Mascher, M., Lui, A.C.W., Wang, L., Lo, C., Ashton, A.R., Ryan, P.R., and Lagudah, E.S. (2019). The wheat *Lr67* gene from the Sugar Transport Protein 13 family confers multipathogen resistance in barley. *Plant Physiology* 179, 1285–1297.
- Milner, S.G., Jost, M., Taketa, S., Mazón, E.R., Himmelbach, A., Oppermann, M., Weise, S., Knüpfner, H., Basterrechea, M., König, P., Schüler, D., Sharma, R., Pasam, R.K., Rutten, T., Guo, G., Xu, D., Zhang, J., Herren, G., Müller, T., Krattinger, S.G., Keller, B., Jiang, Y., González, M.Y., Zhao, Y., Habekuß, A., Färber, S., Ordon, F., Lange, M., Börner, A., Graner, A., Reif, J.C., Scholz, U., Mascher, M., and Stein, N. (2019). Genebank genomics highlights the diversity of a global barley collection. *Nature Genetics* 51, 319–326.
- Milner, S.G., Jost, M., Taketa, S., Mazón, E.R., Himmelbach, A., Oppermann, M., Weise, S., Knüpfner, H., Basterrechea, M., König, P., Schüler, D., Sharma, R., Pasam, R.K., Rutten, T., Guo, G., Xu, D., Zhang, J., Herren, G., Müller, T., Krattinger, S.G., Keller, B., Jiang, Y., González, M.Y., Zhao, Y., Habekuß, A., Färber, S., Ordon, F., Lange, M., Börner, A., Graner, A., Reif, J.C., Scholz, U., Mascher, M., and Stein, N. (2019). Genebank genomics highlights the diversity of a global barley collection. *Nature Genetics* 51, 319–326.
- Mims, C.W., Rodriguez-Lothar, C., and Richardson, E.A. (2002). Ultrastructure of the host-pathogen interface in daylily leaves infected by the rust fungus *Puccinia hemerocallidis*. *Protoplasma* 219, 221–226.
- Modrzejewski, D., Hartung, F., Sprink, T., Krause, D., Kohl, C., Schiemann, J., and Wilhelm, R. (2018). What is the available evidence for the application of genome editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map protocol. *Environmental Evidence* 7, 11.

- Moore, J.W., Herrera-Foessel, S., Lan, C., Schnippenkoetter, W., Ayliffe, M., Huerta-Espino, J., Lillemo, M., Viccars, L., Milne, R., Periyannan, S., Kong, X., Spielmeier, W., Talbot, M., Bariana, H., Patrick, J.W., Dodds, P., Singh, R., and Lagudah, E. (2015). A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* 47, 1494–1498.
- Mylonas, I., Stavrakoudis, D., Katsantonis, D., and Korpetis, E. (2020). Better farming practices to combat climate change. In *Climate Change and Food Security with Emphasis on Wheat* (Elsevier), 1–29.
- Nielsen, S., Yuzenkova, Y., and Zenkin, N. (2013). Mechanism of eukaryotic RNA polymerase III transcription termination. *Science* 340, 1577–1580.
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K.Y., Shimatani, Z., and Kondo, A. (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 353, 6305.
- Nishimasu, H., Shi, X., Ishiguro, S., Gao, L., Hirano, S., Okazaki, S., Noda, T., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Mori, H., Oura, S., Holmes, B., Tanaka, M., Seki, M., Hirano, H., Aburatani, H., Ishitani, R., Ikawa, M., Yachie, N., Zhang, F., and Nureki, O. (2018). Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* 361, 1259–1262.
- Norholm, M.H.H., Nour-Eldin, H.H., Brodersen, P., Mundy, J., and Halkier, B.A. (2006). Expression of the *Arabidopsis* high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. *FEBS Letters* 580, 2381–2387.
- Nürnbergger, T., and Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6, 335–345.
- Ordon, J., Gantner, J., Kemna, J., Schwalgun, L., Reschke, M., Streubel, J., Boch, J., and Stuttmann, J. (2017). Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. *The Plant Journal* 89, 155–168.
- Pallotta, M.A., Graham, R.D., Langridge, P., Sparrow, D.H.B., and Barker, S.J. (2000). RFLP mapping of manganese efficiency in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 1100–1108.
- Parlevliet, J.E. (1976). The genetics of seedling resistance to leaf rust, *Puccinia hordei* Oth. in some spring barley cultivars. *Euphytica* 25, 249–254.
- Parlevliet, J.E. (1985). Resistance of the non-race-specific type. In *The Cereal Rusts, Volume II: Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control* (Elsevier), 501–525.
- Parry, M.A.J., Madgwick, P.J., Bayon, C., Tearall, K., Hernandez-Lopez, A., Baudo, M., Rakszegi, M., Hamada, W., Al-Yassin, A., Ouabbou, H., Labhilili, M., and Phillips, A.L. (2009). Mutation discovery for crop improvement. *Journal of Experimental Botany* 60, 2817–2825.

- Pauwels, K., Podevin, N., Breyer, D., Carroll, D., and Herman, P. (2014). Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations. *New Biotechnology* 31, 18–27.
- Peacock, A.C., and Dingman, C.W. (1968). Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry* 7, 668–674.
- Pedersen, C., van Loren Themaat, E.v., McGuffin, L.J., Abbott, J.C., Burgis, T.A., Barton, G., Bindschedler, L.V., Lu, X., Maekawa, T., Wessling, R., Cramer, R., Thordal-Christensen, H., Panstruga, R., and Spanu, P.D. (2012). Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics* 13, 694.
- Pellegrineschi, A., Noguera, L.M., Skovmand, B., Brito, R.M., Velazquez, L., Salgado, M.M., Hernandez, R., Warburton, M., and Hoisington, D. (2002). Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. *Genome* 45, 421–430.
- Plessis, A., Perrin, A., Haber, J.E., and Dujon, B. (1992). Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics* 130, 451–460.
- Pommerrenig, B., Müdsam, C., Kischka, D., and Neuhaus, H.E. (2020). Treat and trick: common regulation and manipulation of sugar transporters during sink establishment by the plant and the pathogen. *Journal of Experimental Botany* 71, 3930–3940.
- Prescott, J.M., Burnett, P.A., Saari, E.E., Ransom, J.K., Bowman, J.S., Milliano, W.D., Singh, R.P., and Bekele, G. (1986). *Wheat diseases and pests: a guide for field identification*. International Maize and Wheat Improvement Center.
- Proels, R.K., and Hüchelhoven, R. (2014). Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. *Molecular Plant Pathology* 15, 858–864.
- Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany* 56, 1–14.
- Puchta, H., and Fauser, F. (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal* 78, 727–741.
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., and Lim, W.A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152, 1173–1183.
- Que, Q., Chen, Z., Kelliher, T., Skibbe, D., Dong, S., and Cilton, M.-D. (2019). Plant DNA repair pathways and their applications in genome engineering. *Methods in Molecular Biology* 1917, 3–24.
- Ramírez-González, R.H., Borrill, P., Lang, D., Harrington, S.A., Brinton, J., Venturini, L., Davey, M., Jacobs, J., van Ex, F., Pasha, A., Khedikar, Y., Robinson, S.J., Cory, A.T., Florio, T., Concia, L., Juery, C., Schoonbeek, H., Steuernagel, B., Xiang, D., Ridout,

- C.J., Chalhouf, B., Mayer, K.F.X., Benhamed, M., Latrasse, D., Bendahmane, A., Wulff, B.B.H., Appels, R., Tiwari, V., Datla, R., Choulet, F., Pozniak, C.J., Provart, N.J., Sharpe, A.G., Paux, E., Spannagl, M., Bräutigam, A., and Uauy, C. (2018). The transcriptional landscape of polyploid wheat. *Science* 361.
- Ran, F.A., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Sharp, P.A., and Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520, 186–191.
- Rebatchouk, D., Daraselia, N., and Narita, J.O. (1996). NOMAD: a versatile strategy for in vitro DNA manipulation applied to promoter analysis and vector design. *PNAS* 93, 10891–10896.
- Reynolds, M., Foulkes, M.J., Slafer, G.A., Berry, P., Parry, M.A.J., Snape, J.W., and Angus, W.J. (2009). Raising yield potential in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60, 1899–1918.
- Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A.S., Bickle, T.A., Bitinaite, J., Blumenthal, R.M., Degtyarev, S.K., Dryden, D.T.F., Dybvig, K., Firman, K., Gromova, E.S., Gumpert, R.I., Halford, S.E., Hattman, S., Heitman, J., Hornby, D.P., Janulaitis, A., Jeltsch, A., Josephsen, J., Kiss, A., Klaenhammer, T.R., Kobayashi, I., Kong, H., Krüger, D.H., Lacks, S., Marinus, M.G., Miyahara, M., Morgan, R.D., Murray, N.E., Nagaraja, V., Piekarowics, A., Pingoud, A., Raleigh, E., Rao, D.N., Reich, N., Repin, V.E., Selker, E.U., Shaw, P.-C., Stein, D.C., Stoddard, B.L., Szybalski, W., Trautner, T.A., van Etten, J.L., Vitor, J.M.B., Wilson, G.G., and Xu, S.-Y. (2004). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases, and their genes. In *Restriction endonucleases* (Springer), 1–18.
- Rohringer, R. (1977). Calcofluor: An optical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology* 77, 808.
- Ronald, P. (2011). Plant genetics, sustainable agriculture and global food security. *Genetics* 188, 11–20.
- Saeger, J.d., Park, J., Chung, H.S., Hernalsteens, J.-P., van Lijsebettens, M., Inzé, D., van Montagu, M., and Depuydt, S. (2021). *Agrobacterium* strains and strain improvement: Present and outlook. *Biotechnology Advances* 53, 107677.
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E.E., Zandalinas, S.I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., and Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLOS ONE* 6, e21622.
- Serfling, A., Templer, S.E., Winter, P., and Ordon, F. (2016). Microscopic and molecular characterization of the prehaustorial resistance against wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) in Einkorn (*Triticum monococcum*). *Frontiers in Plant Science* 7, 1668.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., and Gao, C. (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols* 9, 2395–2410.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.-L., and Gao, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* 31, 686–688.

- Singh, R.P., Singh, P.K., Rutkoski, J., Hodson, D.P., He, X., Jørgensen, L.N., Hovmøller, M.S., and Huerta-Espino, J. (2016). Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control. *Annual Review of Phytopathology* 54, 303–322.
- Singla, J., Lüthi, L., Wicker, T., Bansal, U., Krattinger, S.G., and Keller, B. (2017). Characterization of *Lr75*: a partial, broad-spectrum leaf rust resistance gene in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 130, 1–12.
- Skoppek, C.I., Punt, W., Heinrichs, M., Ordon, F., Wehner, G., Boch, J., and Streubel, J. (2022). The barley HvSTP13GR mutant triggers resistance against biotrophic fungi. *Molecular Plant Pathology* 23, 278–290.
- Spampinato, C.P. (2017). Protecting DNA from errors and damage: an overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74, 1693–1709.
- Spielmeier, W., Mago, R., Wellings, C., and Ayliffe, M. (2013). *Lr67* and *Lr34* rust resistance genes have much in common--they confer broad spectrum resistance to multiple pathogens in wheat. *BMC Plant Biology* 13, 96.
- Tang, X., Lowder, L.G., Zhang, T., Malzahn, A.A., Zheng, X., Voytas, D.F., Zhong, Z., Chen, Y., Ren, Q., Li, Q., Kirkland, E.R., Zhang, Y., and Qi, Y. (2017). A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nature Plants* 3, 17018.
- Terns, M.P., and Terns, R.M. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Current Opinion in Microbiology* 14, 321–327.
- Thordal-Christensen, H., Gregersen, P.L., and Collinge, D.B. (2000). The barley/*Blumeria* (Syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. In *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* (Springer), 77–100.
- Vazquez-Vilar, M., Bernabé-Orts, J.M., Fernandez-Del-Carmen, A., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., and Orzaez, D. (2016). A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods* 12, 10.
- Vazquez-Vilar, M., Garcia-Carpintero, V., Selma, S., Bernabé-Orts, J.M., Sanchez-Vicente, J., Salazar-Sarasua, B., Ressa, A., Paola, C.d., Ajenjo, M., Quintela, J.C., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., and Orzáez, D. (2021). The GB4.0 Platform, an all-in-one tool for CRISPR/Cas-based multiplex genome engineering in plants. *Frontiers in Plant Science* 12, 689937.
- Voegelé, R.T., and Mendgen, K. (2003). Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *The New Phytologist* 159, 93–100.
- Voytas, D.F. (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology* 64, 327–350.
- Wang, T.L., Uauy, C., Robson, F., and Till, B. (2012). TILLING in extremis. *Plant Biotechnology Journal* 10, 761–772.
- Wang, W., Akhunova, A., Chao, S., and Akhunov, E. (2016). Optimizing multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for wheat. *BioRxiv*.

- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., and Qiu, J.-L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* 32, 947–951.
- Waterworth, W.M., Drury, G.E., Bray, C.M., and West, C.E. (2011). Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *The New Phytologist* 192, 805–822.
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., and Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLOS ONE* 6, e16765.
- Weibull, J., Walther, U., Sato, K., Habekuß, A., Kopahnke, D., and Proeseler, G. (2003). Diversity in resistance to biotic stresses. In *Diversity in Barley - *Hordeum vulgare** (Elsevier), 143–178.
- Weiß, L., Gaelings, L., Reiner, T., Mergner, J., Kuster, B., Fehér, A., Hensel, G., Gahrtz, M., Kumlehn, J., Engelhardt, S., and Hückelhoven, R. (2022). Posttranslational modification of the RHO of plants protein RACB by phosphorylation and cross-kingdom conserved ubiquitination. *PLOS ONE* 17, e0258924.
- Wong, N., Liu, W., and Wang, X. (2015). WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. *Genome Biology* 16, 218.
- Xie, K., Minkenberg, B., and Yang, Y. (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *PNAS* 112, 3570–3575.
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C., and Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology* 14, 327.
- Xuan, Y.H., Hu, Y.B., Chen, L.-Q., Sosso, D., Ducat, D.C., Hou, B.-H., and Frommer, W.B. (2013). Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *PNAS* 110, E3685-3694.
- Yamada, K., Saijo, Y., Nakagami, H., and Takano, Y. (2016). Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. *Science* 354, 1427–1430.
- Yamada, K., Kanai, M., Osakabe, Y., Ohiraki, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). Monosaccharide absorption activity of *Arabidopsis* roots depends on expression profiles of transporter genes under high salinity conditions. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 43577–43586.
- Yan, L., Wei, S., Wu, Y., Hu, R., Li, H., Yang, W., and Xie, Q. (2015). High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using *YAO* promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant* 8, 1820–1823.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.

- Ye, Z., and Ting, J.P.-Y. (2008). NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. *Current Opinion in Immunology* 20, 3–9.
- Zeller, S.L., Kalinina, O., and Schmid, B. (2013). Costs of resistance to fungal pathogens in genetically modified wheat. *Journal of Plant Ecology* 6, 92–100.
- Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E.V., and Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163, 759–771.
- Zhang, J., Rouillon, C., Kerou, M., Reeks, J., Brugger, K., Graham, S., Reimann, J., Cannone, G., Liu, H., Albers, S.-V., Naismith, J.H., Spagnolo, L., and White, M.F. (2012). Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity. *Molecular Cell* 45, 303–313.
- Zutter, J.K.d., Levine, K.B., Deng, D., and Carruthers, A. (2013). Sequence determinants of GLUT1 oligomerization: analysis by homology-scanning mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 20734–20744.

6. Anhang

Tabelle A1: Verwendete Oligonukleotide

Oligo-nukleotid	Sequenz 5'-3'	Verwendung
IK1	ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAG	Klonierung pIK18
IK2	CTGTCAGACCAAGTTTACTC	
IK3	AATATTGAAAAAGGAAGAGTCCAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTC	
IK4	GCACTACATTTTCGCTCGTCGCCAGCCCA	
IK5	CGACGAGCGAAAATGTAGTGCTTACGTTGTC	
IK6	GAGTAACTTGGTCTGACAGGGCTTATTATGCACGCTTAAAAATAATAAAAG	
IK9	CGGAGACCCCAACCCCATGGCAGTTTACACTTTATGCTTCCG	LacZ-Kassette für gRNA-Module
IK10	GAGACCGGCTTAGCGGCCGCTCTATGCGGCATCAGAGC	
IK11	GAAATGTGCGCGGAACCC	Sequenzierung pSH163 Derivate
IK12	CATAGCGTTGCCTTGGTAGG	
IK13	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTTCATTGCTAGATCGGGCCAACATG	Klonierung pIK12
IK14	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTCTCCATCGAGAGAGATAGATTTG	
IK15	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTTCATGGCGCTTCAAGATGGATTACAAG	Klonierung pIK14
IK16	GACC	
IK16	TCTCCTCGAATAGCTGGTTGTACGTCTGC	
IK17	CAACCAGCTATTTCGAGGAGAACCCCATTAATG	
IK18	CGAAGCCATCACTCTTCAGGAAGTCGAG	
IK19	CCTGAAGAGTGATGGCTTCGCGAACCGC	
IK20	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTCTACCCTTCTTCTTCTTCGCC	
IK20	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTCTACCCTTCTTCTTCTTCGCC	
IK23	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTTCAGGTATGGTGAGCAAGGGCG	Klonierung pIK15
IK24	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTCTTACTTATAGCTCATCTTTCT	
IK25	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTTCAGTAGCTCAGGCCTCCATAC	Klonierung pIK16
IK26	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTCTAGCGTAAAACGACGGCCAG	
IK35	CGACGGGCCCCGGGATCCGATGGTCTCGAGGTCAGTAGATTGCAGAGACGGTC	Klonierung pIK19
IK35	GACCTGCAGACTG	
IK36	ATGGCCAGTGTGCCGGCCTCCGTTATCG	
IK37	GAGGCCGGCACACTGGCCATATCGGTGG	
IK38	TTGAGAAATATGTTTTTAGTCTCAGCCAATCCC	
IK39	GACTAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTAGGG	
IK40	CCTCGGAATGCATCTAGATGGTCTCCCTGGTCTACTGAGTCTGAGACGGCG	Klonierung pIK19
IK40	GCCGCATTAG	
IK41	CGACGGGCCCCGGGATCCGATGGTCTCGCCAGCAGTAGATTGAGAAGAGCGTC	Klonierung pIK20
IK41	GACCTGCAGACTG	
IK42	CCTCGGAATGCATCTAGATGGTCTCCCTTCGTCTACTGAGCTGAAGAGCGCG	Klonierung pIK20
IK42	GCCGCATTAG	
IK43	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTTCATGGCGCTTCAAG	Klonierung pIK21
IK44	TAGTCCCAATAGCGAGGCCGATCGAGTAC	
IK45	CGGCCTCGCTATTGGGACTAACTCTGTTG	
IK46	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTCTACCCTTCTTC	
IK46	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTCTACCCTTCTTC	
IK53	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGTCTCGCGGAATTACGCCAAGCTTGC	Klonierung pIK155
IK70	GCTCACATGTTCTTTCTGCG	Sequenzierung pSH163 Derivate
IK71	CACCTGACGTCTAAGAAACC	
IK76	TTCTTAGCCGAGTGGGCTTC	Lr67 Sequenzierung
IK77	TACCACACTGCCTGCTGTTC	
IK78	GCCAGCCAATACGTTTGAAG	
IK79	CCAGAACCAGTGTGTTTCC	
IK80	CTCTCACACACGCGCATTCC	
IK81	TGTTCTCGTCCGATGTCAC	
IK81	TGTTCTCGTCCGATGTCAC	
IK82	CTTGAGGCGGCGGTGGTGTAGG	Lr67 gRNA1
IK83-1	AAACCCTACACCACCCGCCGCT	Lr67 gRNA3
IK83-2	CTTGGCAGGATCCTGCTTGGTTG	
IK84	AAACCAACCAAGCAGGATCCTGC	

IK85	CTTGAGCATGGCGAGGTTCTGGG	Lr67 gRNA2
IK86	AAACCCAGAACCTCGCCATGCT	
IK87	CTTGCAGCGCGCGCCCGGGCG	Lr67 gRNA4
IK88	AAACCGCCGGGCGGCGCGCTG	
IK89	CTTGCCACGGGTGGGCCATCCTGG	Lr67 gRNA5
IK90	AAACCCAGGATGGCCACCCGTGG	
IK91	CTTGGTCATGGTGTGCACCTACG	Lr67 gRNA6
IK92	AAACCGTAGGTGCACACCATGAC	
IK93	CTTGCCCCAGGACCAGGCCAAGG	Lr67 gRNA7
IK94	AAACCTTCGCCTGGTCCTGGGG	
IK97	GATCGAGGCGGCGGGTGGTGTAGGAGGC	Lr67 Testvektor1
IK98	AATTCCTCCTACACCACCCGCCGCTC	
IK99	GATCGGCAGGATCCTGCTTGGTTGCGGC	Lr67 Testvektor3
IK100	AATTGCCGCAACCAAGCAGGATCCTGCC	
IK101	GATCGAGCATGGCGAGGTTCTGGGCGGC	Lr67 Testvektor2
IK102	AATTGCCGCCAGAACCTCGCCATGCTC	
IK103	GATCGCAGCGCGCGCCGCCGCGCGGC	Lr67 Testvektor4
IK104	AATTGCCGCGCGGGCGGCGCGCTGC	
IK105	GATCCACGGGTGGGCCATCCTGGTGGC	Lr67 Testvektor5
IK106	AATTGCCACCAGGATGGCCACCCGTGG	
IK107	GATCGGTCATGGTGTGCACCTACGTGGC	Lr67 Testvektor6
IK108	AATTGCCACGTAGGTGCACACCATGACC	
IK109	GATCGCCCCAGGACCAGGCCAAGGAGGC	Lr67 Testvektor7
IK110	AATTCCTCCTTCGCCTGGTCCTGGGGC	
IK113	TGGCGCAAGAACAAGATGCTGCT	HvLox1 gRNA1
IK114	AAACAGCAGCATCTTGTTCTTGCC	
IK115	TGGCGCTCTTGTTGCCCCCGTGA	HvLox1 gRNA2
IK116	AAACTCACGGGGGCGAACAAGAGC	
IK117	GATCGCAAGAACAAGATGCTGCTGGGC	HvLox1 Testvektor
IK118	AATTGCCAGCAGCATCTTGTTCTTGCC	1
IK119	GATCGCTCTTGTTGCCCCCGTGAGGGC	HvLox1 Testvektor
IK120	AATTGCCCTCACGGGGGCGAACAAGAGC	2
IK121	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGGCCCTTAAGGCCTAGGTCGAGACCGTCGACC	Klonierung pIK48
	TGCAGACTG	
IK122	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCCATGGCGGCCACGGATGAGACCGCGGCCG	
	CATTAGGCA	
IK123	CCTCGGAATGCATCTAGATGGTCTCCCTGGTCTACTGAGGGTGAGACGGCG	Klonierung pIK60
	GCCGCATTAG	
IK124	CCTCGGAATGCATCTAGATGGTCTCCCTGGTCTACTGACCGTGAGACGGCG	Klonierung pIK61
	GCCGCATTAG	
IK130	GGTGTCTCAGCGAGATCGAAATTCGACTTGAAGTTGGGCGTG	Klonierung pIK73
IK131	GCAATTTTCATTCAGCTGATTCACGATGACAGCCTCACATTC AAGGAGG	
IK132	CCTTCTGCAGCACGCCAGCGGAAGCCAGCAT	Klonierung pIK73
IK133	GGCTTCCGCTGGCGTGCTGCAGAAGGGGAAC	
IK134	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTTCATTGAGTGCAGCGTGACCCGGTTCG	Klonierung pIK74
IK135	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTCTCCACTGCAGAAGTAACACCAAAC	
IK136	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTCATTGCCTTTTTTTCTTCTTCTTCG	Klonierung pIK75
IK137	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTAAGCTAATGCCAACTTTGTACAAG	
IK138	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTCAGCTTCTTTTTTTCTTCTTCTTCG	Klonierung pIK76
IK139	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTAGGGTAATGCCAACTTTGTACAAG	
IK140	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTCACCTCTTTTTTTCTTCTTCTTCG	Klonierung pIK77
IK141	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTACCGTAATGCCAACTTTGTACAAG	
IK142	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTCACGGTCTTTTTTTCTTCTTCTTCG	Klonierung pIK78
IK143	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTAGTCTAATGCCAACTTTGTACAAG	
IK144	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTTCATTGAAAAATTACGGATATGAATAT	Klonierung pIK79
	AGG	
IK145	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTTCGAGCATGGATTACAAGGACCACG	
IK147	TCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGCTCTTCGAGCATGGATAAGAAGTACTCTATC	Klonierung pIK81
IK148	TAAGAAACCGACGGCCAGTGGCTCTTACCTCAAACCTTCTTCTTCTTC	

IK155	CCTCGGAATGCATCTAGATGGTCTCCCTGGTCTACTGAAGCTGAGACGGCG GCCGATTAG	Klonierung pIK89
IK156	GTGTGGACACGTTGCCTTTG	Lr67
IK157	GAAACTGCACACGGGTTACG	Sequenzierung
IK160	CTACGGCAGCAAGATCC	
IK163	GTCGGTCATCTCCTCGATGG	
IK172	CTTGGCGATGAGCATGGTGAGG	Lr67 gRNA8
IK173	AAACCCTCACCATGCTCATCGC	
IK174	CTTGCCGGCGTCTTCTTCATCAT	Lr67 gRNA9
IK175	AAACATGATGAAGAAGACGCCGG	
IK176	CTTGAACCTCGCCATGCTCATCAT	Lr67 gRNA10
IK177	AAACATGATGAGCATGGCGAGGTT	
IK178	CTTGGCAGGATCCTGCTTGGTTG	Lr67 gRNA3
IK179	AAACCAACCAAGCAGGATCCTGC	
IK180	CTTGATCATCGGCAGGATCCTGCT	Lr67 gRNA12
IK181	AAACAGCAGGATCCTGCCGATGAT	
IK182	CTTGATCCTGCCGATGATGAGCA	Lr67 gRNA11
IK183	AAACTGCTCATCATCGGCAGGAT	
IK184	CTTGACAGGATGTTGAGCCCGCCG	Lr67 gRNA13
IK185	AAACCGGCGGGCTCAACATCCTGT	
IK186	CTTGTTCGGAACCTGGTGAACATA	Lr67 gRNA14
IK187	AAACTAGTTCACCAGGTTTCGCGAA	
IK237	GCGGAGTGACATCGATGGAC	Lr67
IK261	GTGAACTGCTGGAAGATCTG	Sequenzierung
IK241	TCGCCTCCACGATCTCGTTG	Lr67/HvStp13
IK249	GCGGAGGGTTCGCCGTGTCG	Sequenzierung
IK253	CCTGTTCTGTGCGGAGATCG	
IK259	CTGGTTCGCTGGTTGGTGTC	Sequenzierung
IK268	CTCACTGCTAGGAGGGAATC	Module
IK263	GCGTAGGAAAATCGTCCATAG	HvStp13
IK264	TGGAGCCCGAGTTCAACGAG	Sequenzierung
IK265	GTCGTCCATGTAGCGCTTCC	
IK266	GCGGGTAACATCTATGGAC	
IK302	GAGCCACCGCTAGCTTTACG	
IK273	CACGATCGGCTCTAGATCGG	Hygromycin PCR
IK274	CGGGAGATGCAATAGGTCAG	
IK304_b1	ATCACGCCACCTTCTTCGCCTCCTAC	Lr67 Amplikon
IK305_b2	CGATGTCCACCTTCTTCGCCTCCTAC	Tiefen-
IK306_b3	TTAGGCCACCTTCTTCGCCTCCTAC	sequenzierung
IK307_b4	TGACCACCACCTTCTTCGCCTCCTAC	
IK308_b5	ACAGTGCCACCTTCTTCGCCTCCTAC	
IK309_b6	GCCAATCCACCTTCTTCGCCTCCTAC	
IK310_b7	CAGATCCACCTTCTTCGCCTCCTAC	
IK311_b8	ACTTGACCACCTTCTTCGCCTCCTAC	
IK312_b9	GATCAGCTGAAGCTGGTGGAAATTTG	Lr67 Amplikon
IK313_b10	ACTGATCTGAAGCTGGTGGAAATTTG	Tiefen-
IK314_b11	ATGAGCCTGAAGCTGGTGGAAATTTG	sequenzierung
IK315_b12	ATTCTCTGAAGCTGGTGGAAATTTG	
IK316_b13	CAAAAAGCTGAAGCTGGTGGAAATTTG	
IK317_b14	CAACTACTGAAGCTGGTGGAAATTTG	
IK318_b15	CACCGGCTGAAGCTGGTGGAAATTTG	
IK319_b16	CACGATCTGAAGCTGGTGGAAATTTG	
IK320_b1	ATCACGCCTGTTCTGTCGGAGATCG	Lr67 Amplikon
IK321_b2	CGATGTCTGTTCTGTCGGAGATCG	Tiefen-
IK322_b3	TTAGGCCCTGTTCTGTCGGAGATCG	sequenzierung
IK323_b4	TGACCACCTGTTCTGTCGGAGATCG	
IK324_b5	ACAGTGCCCTGTTCTGTCGGAGATCG	
IK325_b6	GCCAATCCTGTTCTGTCGGAGATCG	
IK326_b7	CAGATCCCTGTTCTGTCGGAGATCG	
IK327_b8	ACTTGACCTGTTCTGTCGGAGATCG	

IK328_b9	GATCAGTCGCCTCCACGATCTCGTTG	Lr67 Amplikon Tiefen- sequenzierung	
IK329_b10	ACTGATTCGCCTCCACGATCTCGTTG		
IK330_b11	ATGAGCTCGCCTCCACGATCTCGTTG		
IK331_b12	ATTCCTTCGCCTCCACGATCTCGTTG		
IK332_b13	CAAAAGTCGCCTCCACGATCTCGTTG		
IK333_b14	CAACTATCGCCTCCACGATCTCGTTG		
IK334_b15	CACCGGTCGCCTCCACGATCTCGTTG		
IK335_b16	CACGATTCGCCTCCACGATCTCGTTG		
IK336	TGCGGACCATGATTACGCCATTGGTCTCACGAAACGGCCAGTGAATTTCG	Klonierung pIK155	
IK367	CTTGCAGGATCCTGCTTGGTTG	Lr67 gRNA3-2	
IK368	AAACCAACCAAGCAGGATCCTG	Lr67 gRNA3-2	
IK369_b11	GATCAGTTGAAGCTGGTGGAAATTTTG	Lr67 Amplikon Tiefen- sequenzierung	
IK372_b16	CAACTATTGAAGCTGGTGGAAATTTTG		
IK373_b17	CACCGGTTGAAGCTGGTGGAAATTTTG		
IK374_b18	CACGATTTGAAGCTGGTGGAAATTTTG		
IK375_b19	CACTCATTGAAGCTGGTGGAAATTTTG		
IK376_b20	CAGGCGTTGAAGCTGGTGGAAATTTTG		
IK370_b1	ATCACGTGCAGGCCGTTCCCTGTTC		Lr67 Amplikon Tiefen- sequenzierung
IK377_b2	CGATGTTGCAGGCCGTTCCCTGTTC		
IK378_b3	TTAGGCTGCAGGCCGTTCCCTGTTC		
IK379_b4	TGACCATGCAGGCCGTTCCCTGTTC		
IK380_b5	ACAGTGTGCAGGCCGTTCCCTGTTC		
IK381_b6	GCCAATTGCAGGCCGTTCCCTGTTC		
IK382_b7	CAGATCTGCAGGCCGTTCCCTGTTC		
IK383_b8	ACTTGATGCAGGCCGTTCCCTGTTC		
IK371_b11	GATCAGGGTGTTCGGTGACGAAGAGCG	Lr67 Amplikon Tiefen- sequenzierung	
IK384_b12	ACTGATGGTGTTCGGTGACGAAGAGCG		
IK385_b13	ATGAGCGGTGTTCGGTGACGAAGAGCG		
IK386_b14	ATTCCTGGTGTTCGGTGACGAAGAGCG		
IK387_b15	CAAAAGGGTGTTCGGTGACGAAGAGCG		
IK388_b16	CAACTAGGTGTTCGGTGACGAAGAGCG		
IK389_b17	CACCGGGGTGTTCGGTGACGAAGAGCG		
IK390_b18	CACGATGGTGTTCGGTGACGAAGAGCG		
IK403	CCCTGTAAACCGGAAAGGAG		Lr67 Sequenzierung
IK404	GGACAGGCCATCTGCATTTG		
IK405	GTCGTCCATGAATCTCTTCC		
IK406	GTTAAGGCCGTCTGCATTTG		
IK407	GGTCGTTCGTTCGTCCATGAAG		
IK410	CGTTTCTGAATTTTCATCTTG		
IK411	GGAGTAGTAACGCTTTTCAG		
pSH163_S1	CTCGGAATGCATCTAGATC	Sequenzierung pSH163 Derivate	
pSH163_S2	GCTGCGCCTTATCCGGTAAC		
pSH163_S3	CAGTGAGGCACCTATCTCAG		
pSH163_S4	CACCTGACGTCTAAGAAACC		
HvLox1	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCTGCCATTGGTTGGAGCAGTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCACGTTCTTGCGCATG	HvLox1 Amplikon Tiefen- sequenzierung	
HvLox1	AG		

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Dr. Jochen Kumlehn für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu absolvieren und für die zahlreichen Hinweise, Anregungen und Diskussionen bedanken. Ein so vertrauensvoller und freundschaftlicher Umgang zwischen Vorgesetzten und Mitarbeitern ist denke ich nicht selbstverständlich und umso mehr weiß ich Jochen als Chef sehr zu schätzen.

Ein großer Dank gilt auch Prof. Dr. Thomas Debener für die Übernahme der Tätigkeit als Betreuer meiner Arbeit seitens der Universität. Ebenso möchte ich mich bei den weiteren Referenten und Prüfern bedanken.

Ich möchte mich bei Dr. Dragan Perovic, Dr. Albrecht Serfling und deren Arbeitsgruppen am JKI in Quedlinburg für die unterstützende Durchführung der Resistenztests bedanken. Da ein Pflanzenwissenschaftler nichts ohne Pflanzen ist, möchte ich besonders Cornelia Marthe, Sybille Freist und Sabine Sommerfeld für die Weizen- bzw. Gerstentransformationen sowie dem Gärtnerteam, insbesondere Kerstin Jacobs, für die Pflege der Pflanzen danken.

Natürlich möchte ich mich ganz herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Diskussionen und Unterstützungen bedanken. Besonders unsere zahlreichen Aktivitäten, wie z.B. Wanderausflüge und Kochabende, haben die letzten 5 Jahre zu einer besonders schönen Zeit gemacht und ich freue mich, dass viele Kollegen zu guten Freunden wurden. Zudem möchte ich Ingrid Otto und Barno Rezaeva für die tolle Bürogemeinschaft und den Zusammenhalt in schwierigen Zeiten danken.

Bei meinen Eltern und Großeltern möchte ich mich für die beständige Unterstützung und den Glauben an mich bedanken. Trotz der nicht ganz einfachen Familiensituation haben wir einen tollen Zusammenhalt und können uns immer aufeinander verlassen.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Freunden, nah und fern, für die Freundschaft und das Kontakt halten trotz Distanz, Studium, Arbeit und/oder Familie bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinem Ehemann Robert bedanken. Wir sind nicht nur auf Arbeit, sondern auch im echten Leben ein tolles Team und ich kann mich sehr glücklich schätzen, in ihm meinen besten Freund und die Liebe meines Lebens gefunden zu haben. Ich freue mich auf die Zukunft und unser gemeinsames Leben.

Bei meiner Schwieger-Familie möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Vor- und Zuname	Iris Valerie Olga Hoffie (geborene Koeppel)
Geburtstag	20.05.1991
Geburtsort	Neuendettelsau
Adresse	An der alten Mühle 20 06466 Seeland, OT Gatersleben
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

10/2014 – 10/2016	M. Sc. Biochemie und Molekularbiologie an der Universität Potsdam Masterarbeit mit dem Titel: Identification of HSFA2-interacting proteins and phosphorylation sites during heat stress memory
10/2011 – 09/2014	B. Sc. Biologie an der Universität Hamburg Bachelorarbeit mit dem Titel: Phänotypanalyse von Mitochondrien der <i>Pentatricopeptide repeat 6 (appr6-)</i> Mutante und Herstellung einer induzierbaren <i>APPR6</i> -Knockdown-Mutante in <i>Arabidopsis thaliana</i>
09/2001 – 06/2010	Gymnasium Schenefeld Abschluss: Abitur
09/1997 – 07/2001	Grundschule Altgemeinde in Schenefeld

Erwerbslosigkeit

11/2016 – 03/2017	Arbeit suchend
-------------------	----------------

Berufserfahrung

seit 04/2017	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben ➤ Beginn des Promotionsvorhabens
07/2014 – 10/2014	Laboraushilfe bei AmpTec GmbH (Minijob)

Kenntnisse

Fremdsprachen	Englisch (fließend)
	Französisch (Grundkenntnisse)
IT-Kenntnisse	MS-Office (sehr gut)
	R-Statistik (Grundlagen)

Publikationen

Steckenborn, S., Cuacos, M., Ayoub, M.A., Feng, C., Schubert, V., **Hoffie, I.**, Hensel, G., Kumlehn, J., Heckmann, S., 2022. The meiotic topoisomerase VI B subunit (MTOPIVIB) is essential for meiotic DNA double-strand break formation in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Reproduction. <https://doi.org/10.1007/s00497-022-00444-5>

Beier, S., Ulpinnis, C., Schwalbe, M., Münch, T., Hoffie, R., **Koepfel, I.**, Hertig, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Pathi, K.M., Hensel, G., Grosse, M., Chamas, S., Gerasimova, S., Kumlehn, J., Scholz, U., Schmutzer, T., 2020. Kmasker plants - a tool for assessing complex sequence space in plant species. The Plant Journal 102, 631–642. <https://doi.org/10.1111/tpj.14645>.

Koepfel, I., Hertig, C., Hoffie, R., Kumlehn, J., 2019. Cas endonuclease technology-A quantum leap in the advancement of barley and wheat genetic engineering. International Journal of Molecular Sciences 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20112647>.