

DNA-Rekombination im Kerngenom höherer Pflanzen



Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

(Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Holger Puchta

geb. am 14. 8. 1960 in Ingolstadt

Gutachter/in

1. Frau Prof. Dr. Ulla Bonas, Halle
2. Herr Prof. Dr. Paul Hooykaas, Leiden
3. Herr Prof. Dr. Ralf Reski, Freiburg

Halle (Saale), 13. Juni 2000

Verzeichnis der in der Arbeit zusammengefassten Veröffentlichungen

- Puchta H. and Hohn B. (1991) A transient assay in plant cells reveals a positive correlation between extrachromosomal recombination rates and length of homologous overlap. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2693-2700.
- Puchta H. and Hohn B. (1991) The mechanism of extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 1-7.
- Puchta H., Kocher S. and Hohn B. (1992) Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells is fast and is not affected by CpG methylation. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3372-3379.
- Puchta H., Dujon B. and Hohn B. (1993) Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5034-5040.
- Puchta H., Swoboda P. and Hohn B. (1994) Homologous recombination in plants. *Experientia* **50**, 277-284.
- Puchta H. and Meyer P. (1994) Substrate specificity of plant recombinases determined in extrachromosomal recombination systems. In "Homologous recombination and gene silencing in plants", J. Paszkowski Edt., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 123-155.
- Tinland B., Hohn B. and Puchta H. (1994) *Agrobacterium tumefaciens* transfers single stranded T-DNA into the plant cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8000-8004.
- Swoboda P., Gal S., Hohn B. and Puchta H. (1994) Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *EMBO J.* **13**, 484-489.
- Puchta H., Swoboda P. and Hohn B. (1995) Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *Plant J.* **7**, 203-210.
- Puchta H., Swoboda P., Gal S., Blot M. and Hohn B. (1995) Somatic intrachromosomal homologous recombination events in populations of plant siblings. *Plant Mol. Biol.*, **28**, 281-292.
- Puchta H. and Hohn B. (1996) From centiMorgans to basepairs: Homologous recombination in plants. *Trends in Plant Sci.* **1**, 340-348.
- Puchta H., Dujon B. and Hohn B. (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5055-5060.
- Puchta H. (1998) Towards targeted transformation in plants. *Trends in Plant Sci.* **3**, 77-78.
- Puchta H. (1998) Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. *Plant J.* **13**, 331-339.
- Salomon S. and Puchta H. (1998) Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J.* **17**, 6086-6095.
- Hohn B. and Puchta H. (1999) Gene therapy in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8321-8323.
- Puchta H. (1999) Doppelstrangbruchreparatur und Genomevolution bei Pflanzen. *Biospektrum* **5**, 105-108.
- Puchta H. (1999) Use of I-SceI to induce double-strand breaks in *Nicotiana*. In "DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems", Methods in Molecular Biology, D.S. Henderson Edt., Humana Press, New Jersey, 447-451.
- Puchta H. (1999) Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics* **152**, 1173-1181.

Hypothesen sind Netze, nur der wird fangen, der auswirft.

Novalis, zitiert nach Karl Popper, Logik der Forschung, 1934

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	4
2. Grundlagen der hier zusammengefaßten Arbeiten	5
3. Homologe Rekombination	6
3.1. Extrachromosomale Rekombination	8
3.2. Intrachromosomale Rekombination	10
4. Doppelstrangbruchreparatur (DSBR)	12
4.1. DSBR mittels homologer Rekombination	14
4.2. DSBR mittels illegitimer Rekombination	17
5. Ausblick	19
6. Literaturverzeichnis	21
7. Der Habilitation zugrunde liegende Veröffentlichungen	29
Erklärung über den persönlichen Anteil an den wissenschaftlichen Publikationen	31
Lebenslauf	33
Danksagung	34
Eidesstattliche Erklärung	35

1. Einleitung

Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Träger der Erbinformation aller Lebewesen. Prozesse, die eine Neukombination von Erbanlagen zur Folge haben, werden allgemein als Rekombination bezeichnet. Jede DNA-Rekombination kann potentiell auch immer zu einer „Neukombination“ von genetischer Information führen. Im Kerngenom von höheren Eukaryonten kommt es sowohl in somatischen Zellen als auch kontrolliert und programmiert während der Meiose zu DNA-Rekombinationsvorgängen.

In somatischen Zellen dient die DNA-Rekombination vor allem der Reparatur von Schäden im Erbmaterial. Die Erbsubstanz ist anfällig gegen physikalische und chemische Agentien, die aus der Umwelt auf den Organismus einwirken. Neben Mutationen kann es auch zur Ausbildung von Brüchen in der DNA kommen. Diese Brüche müssen mittels DNA-Rekombination repariert werden, bevor das genetische Material repliziert werden kann. Im Prinzip gibt es zwei verschiedene Arten von DNA-Rekombination (Übersicht: Leach, 1996). Einerseits können DNA-Moleküle im Bereich gleicher Sequenzabfolgen („Homologien“) miteinander verknüpft werden. Man spricht deshalb von „homologer“ Rekombination. Diese Art der Verknüpfung ist meist konservativ, d.h. im Verknüpfungsbereich der homologen Sequenzen treten keine Veränderungen auf. Die Reparatur eines DNA Doppelstrangbruchs (DSB) mittels homologer Rekombination führt also zur Wiederherstellung der DNA Sequenz, so wie sie ursprünglich vor dem Reparaturereignis vorhanden war. Dies ist biologisch sinnvoll, da die genetische Information wie z.B. ein offener Leserahmen für ein Protein erhalten bleibt. Homologe Rekombination ist der hauptsächliche Rekombinationsweg in Bakterien (Übersicht: Cramerini-Otero and Hsieh, 1995; West, 1997; Mosig, 1998) und somatischen Zellen niederer Eukaryonten wie z.B. der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Haber, 1998).

Auch während der Meiose finden homologe Rekombinationsvorgänge statt. Dies hat zur Folge, daß das Erbgut der beiden Eltern „gemischt“ an die nächste Generation weitergegeben wird. Es kommt bei der meiotischen Rekombination im Bereich der Rekombinationspunkte zu keinen Mutationen auf der molekularen Ebene. Die programmierten Veränderungen kommen vielmehr durch die Neukombination der genetischen Information von väterlichen und mütterlichen Chromosomenabschnitten zustande, die zwischen den Rekombinationspunkten liegen. Ausgelöst wird die meiotische Rekombination durch das Auftreten von Doppelstrangbrüchen, die an spezifischen Stellen - meist im Promoter-Bereich

von Genen - zeitlich programmiert auftreten und jeweils mit Hilfe der allelischen homologen Sequenz des anderen Elternchromosoms repariert werden (Übersicht: Roeder, 1997; Zickler and Kleckner, 1998).

Anfangs war man überrascht neben der biologisch sinnvoll erscheinenden homologen Rekombination noch eine zweite Art der DNA Rekombination zu finden. Bei dieser Art der Verknüpfung spielen längere Sequenzhomologien keine Rolle. Im Vergleich zu den Ausgangsmolekülen kommt es hierbei zu Veränderungen in der Basenabfolge (Übersichtsartikel: Roth and Wilson, 1989). Die nach der Rekombination codierte biologische Information unterscheidet sich deshalb von der ursprünglich codierten Information, der Vorgang ist mutagen. Diese Art der Rekombination wurde deshalb auch als „illegitim“ bezeichnet. Illegitime Rekombination ist der Hauptweg der DNA-Verknüpfung in somatischen Zellen höherer Eukaryonten wie Säugern und Pflanzen. Jedoch scheinen prinzipiell alle Organismen in der Lage zu sein, sowohl homologe als auch illegitime DNA Rekombination durchführen zu können. So werden bei Bakterien und Hefe bei Abwesenheit von homologen Sequenzen DNA Moleküle mittels illegitimer Rekombination repariert. Andererseits findet man in somatischen Zellen höherer Eukaryonten neben der effizienten illegitimen Rekombination auch homologe Rekombinationsreaktionen (Übersichtsarbeiten zur DNA-Rekombination in Pflanzen: Puchta *et al.*, 1994 [Referenz 1 in der Liste der der Habilitation zugrunde liegenden Veröffentlichungen, siehe S. 25]; Puchta and Hohn, 1996 [3]; Vergunst and Hooykaas, 1999).

2. Grundlagen der hier zusammengefaßten Arbeiten

In den hier zusammengefaßt vorliegenden Arbeiten wurden im Laufe einer Dekade verschiedene Aspekte der DNA-Rekombination in somatischen Pflanzenzellen charakterisiert. Diese Untersuchungen sind von besonderer Signifikanz, da Pflanzen im Gegensatz zu Säugern keine präformierte Keimbahn besitzen und somit somatische Veränderungen, die vor der Blütenbildung im meristematischen Gewebe auftreten, an die nächste Generation weitergegeben werden können (Walbot, 1984; Das *et al.*, 1990). Die Analyse somatischer Veränderungen ist auch wichtig, da bei der Herstellung von transgenen Pflanzen normalerweise somatisches Gewebe transformiert und nach Samenbildung transgenes Material der nächsten Generation gewonnen wird.

Experimenteller Ausgangspunkt aller hier vorgestellten Arbeiten ist die Verwendung von Reportergenen. Dabei wurden bei den Untersuchungen zur homologen Rekombination die Rekombinationsassaysysteme so konstruiert, daß bei einem entsprechenden Rekombinationsereignis aus nicht-funktionellen, überlappenden Teilen eines Reportergens ein funktioneller Leserahmen restauriert wurde und so die Neuverknüpfung mittels Enzymtests bzw. Selektion nachgewiesen werden konnte. Bei den Untersuchungen zur illegitimen Rekombination wurde ein Reporter gen verwendet, mit dem man auf Ereignisse selektionieren konnte, die mit der Zerstörung des Reporter gens einhergingen (negativer Selektionsmarker).

3. Homologe Rekombination

Untersuchungen zur homologen Rekombination in somatischen Zellen höherer Pflanzen sind von großem Interesse, da es seit langem vielfältige Versuche zur Etablierung einer „Gene Targeting“ Technik gegeben hat (Paszkowski *et al.*, 1988; Offringa *et al.*, 1990, 1993; Lee *et al.*, 1990; Halfter *et al.*, 1992; Hroudá and Paszkowski, 1994; De Groot *et al.*, 1994; Risseuw *et al.*, 1995, 1997; Thykjaer *et al.*, 1997; Gallego *et al.*, 1999). Mittels dieser Technik können in verschiedenen Organismen durch homologe Rekombination zwischen einer in die Zelle eingebrachten DNA und dem Kerngenom kontrolliert Gene ausgeschaltet oder verändert werden. „Gene Targeting“ wird seit langem routinemäßig in Bakterien und Hefe angewandt. Besonders eindrucksvoll sind die mit dieser Technik erzielten Erfolge bei der Maus. Seitdem es gelungen ist, in embryonalen Stammzellen effizient Gene auszuschalten (Doetschman *et al.*, 1997; Thomas and Cappechi, 1987) konnte die biologische Funktion von hunderten von Genen am Mausmodell ermittelt werden (Übersichtsartikel: Jasin *et al.*, 1996). Obwohl bei Pflanzen in einigen Fällen die „Lösung“ des „Gene Targeting“ Problems verkündet wurde (Miao and Lam, 1995; Kempin *et al.*, 1997), konnte bis heute keine effiziente Methode entwickelt werden. Die bisher erreichten Frequenzen liegen bei Pflanzen um mehrere Größenordnungen unterhalb derer, die in anderen Organismen routinemäßig erzielt werden (siehe Puchta, 1998b [5]; Vergunst and Hooykaas, 1999; Hohn and Puchta, 1999 [7]).

Ein interessanter Ansatz zur Etablierung der „Gene Targeting“ Technik in Pflanzen ist die Expression bakterieller Proteine, die in homologe Rekombinationsvorgänge involviert sind. Tatsächlich konnte so in somatischen Pflanzenzellen die Frequenz homologer Rekombinationsvorgänge wie z.B. der intrachromosomalen Rekombination erhöht werden

(Reiss *et al.*, 1996; Shalev *et al.*, 1999). Ob allerdings die „Gene Targeting“ Technik selbst mit diesem Ansatz mit annehmbaren Frequenzen durchführbar ist, ist zur Zeit noch eine offene Frage, die nur durch weitere Experimente beantwortet werden kann. Ein weiterer aktueller Ansatz zur gezielten Veränderung des Pflanzengenoms ist der Einsatz von chimären Oligonukleotiden (Übersicht: Hohn and Puchta, 1999 [7]). Chimäre Oligonukleotide (COs) sind partiell selbstkomplementär und bestehen aus einer Kombination von DNA und 2'-O-methylierter RNA (Übersicht: Ye *et al.*, 1998). Die COs sind auch komplementär zu der zu verändernden genomischen Sequenz. Sie tragen jedoch einzelne Mutationen oder Deletionen, die ins Genom eingeführt die codierte Information des entsprechenden Gens verändern sollen. Der Mechanismus der Reparatur mit COs unterscheidet sich dabei grundsätzlich vom klassischem „Gene Targeting“: Es konnte gezeigt werden, daß bei Säugern die Funktion der COs von der „Mismatch“-Reparatur abhängt (Cole-Strauss *et al.*, 1999). In somatischen Säugerzellen konnten mit COs bereits eine Reihe von gezielten genomischen Veränderungen vorgenommen werden (z.B. Yoon *et al.*, 1996; Cole-Strauss *et al.*, 1996; Alexeev and Yoon, 1998). Allerdings sind die bisherigen Versuche diese Technik auch bei Pflanzen zu etablieren wenig überzeugend, da die erhaltenen Frequenzen ähnlich niedrig wie bei den schon beschriebenen „Gene Targeting“ Experimenten sind. Besonders problematisch ist jedoch die Tatsache, daß durch die Applikation der COs in der Mehrzahl der Fälle nicht die gewünschte Veränderung sondern andere Mutationen im Zielgen verursacht wurden (Zhu *et al.*, 1999; Beetham *et al.*, 1999).

Einen Durchbruch stellt die Entdeckung dar, daß im Moos *Physcomitrella patens* homologe Integration von DNA mit großer Effizienz abläuft (Schaefer and Zryd, 1997). So konnte bereits ein für die Teilung von Organellen verantwortliches Gen ausgeschaltet werden (Strepp *et al.*, 1998). Es ist zu erwarten daß mit Etablierung der „Gene Targeting“ Technik in Moos noch eine Vielzahl weiterer pflanzenspezifische Fragestellungen beantwortet werden kann (Puchta, 1998b [4]; Reski, 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit zusammengefaßten Untersuchungen befaßten sich nicht direkt mit der „Gene Targeting“ Problematik. Vielmehr sollten die grundsätzlichen Eigenschaften von homologer Rekombination in höheren Pflanzen mittels extra- und intrachromosomaler Modellsysteme untersucht werden.

3.1. Extrachromosomale Rekombination

Die einfachste und schnellste Art DNA-Rekombinationsvorgänge in Pflanzen zu untersuchen ist extrachromosomale DNA-Moleküle in somatische Pflanzenzellen einzubringen und danach ihr Rekombinationsverhalten zu testen. Grundsätzlich wurden hierbei, auf ein oder mehrere DNA-Moleküle verteilt, nicht funktionelle, überlappende Teile von Reporter genen in Pflanzenzellen transferiert, die durch homologe Rekombination in der entsprechenden Zelle zum funktionellen Gen restauriert wurden (Übersichtsartikel zur extrachromosomalen Rekombination: Puchta and Meier, 1994 [2]). Dabei wurden neben Plasmid DNAs, die durch Elektroporation, PEG Transformation oder „Particle Gun“-Beschießung in Pflanzenzellen eingebracht wurden, auch T-DNA Moleküle von *Agrobacterium tumefaciens* verwendet (Offringa *et al.*, 1990; Tinland *et al.*, 1994 [11]). In den ersten Arbeiten wurde die Restauration von Selektionsmarkergenen zur Detektion von extrachromosomaler Rekombination in Tabak verwendet (Wirz *et al.*, 1987; Baur *et al.*, 1990; Offringa *et al.*, 1990). In den eigenen Arbeiten wurde als alternatives System ein auf der Expression von β -Glucuronidase beruhendes transientes Assaysystem in *Nicotiana glumabagineofolia* Protoplasten entwickelt (Puchta and Hohn, 1991a [8]). Dieses System ist wesentlich einfacher zu handhaben und führt innerhalb weniger Tage - im Gegensatz zu mehreren Wochen mit den Selektionsmarkergenen - zu Ergebnissen und findet rege Anwendung in der neueren Literatur (z.B. Masson and Paszkowski, 1997; Albinsky *et al.*, 1999; Shalev *et al.*, 1999). Parallel zu unseren Untersuchungen wurde ein auf der transienten Expression der β -Glucuronidase beruhendes extrachromosomales Assaysystem von Lyznik und Mitarbeitern (1991) in Mais entwickelt.

In unseren weiteren Arbeiten wurden die extrachromosomalen Rekombinationsvorgänge im Detail charakterisiert. So konnten wir zeigen, daß der Mechanismus der extrachromosomalen Rekombination in Pflanzen hauptsächlich nach dem „Single Strand Annealing“ Modell abläuft (Abb. 1; Puchta and Hohn, 1991b [9]). Aus den doppelsträngigen Plasmidmolekülen werden durch pflanzliche Exonukleasen einzelsträngige DNA-Bereiche freigesetzt, die dann - über Basenpaarungen („Annealing“) - miteinander interagieren können. Die so erhaltene Zwischenstufe wird mittels pflanzlicher Enzyme in einen „reparierten“ Doppelstrang überführt. Der Mechanismus der Rekombination entspricht dem für Säugerzellen (Lin *et al.*, 1984, 1990) und *Xenopus* Oozyten (Maryon and Carroll, 1991a, 1991b) ermittelten und ist nicht nur bei höheren Eukaryonten, sondern auch bei Hefe

(Fishman-Lebel *et al.*, 1992) zu finden. Unsere mit dem transienten Assay erzielten Ergebnisse zum Mechanismus der extrachromosomalen Rekombination wurden durch Untersuchungen anderer Gruppen unter Verwendung von Selektionsmarkergenen und einzelsträngiger DNA bestätigt (De Groot *et al.*, 1992; Bilanz *et al.*, 1992).

Bei der weiteren Charakterisierung der extrachromosomalen Rekombination in Pflanzenzellen konnten wir zeigen, daß die Rekombinationsreaktion im wesentlichen nur innerhalb einer kurzen Zeitdauer nach Transfektion der DNA-Moleküle stattfindet (ca. 30 Minuten). Dabei spielt es keine Rolle, ob die DNA-Moleküle methyliert sind (Puchta *et al.*, 1992 [10]). Die hohe Effizienz, mit der extrachromosomal „nackte“ DNA-Moleküle rekombinieren, steht in krassem Gegensatz zu genomischen Sequenzen (intrachromosomale Rekombination oder „Gene Targeting“). Die Chromatinstruktur scheint also bei der Stabilität des hochrepetitiven Pflanzengenoms eine große Rolle zu spielen.

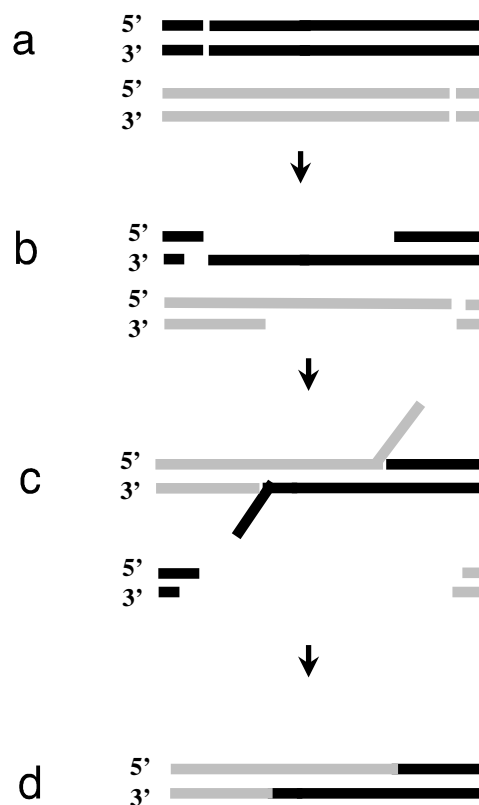


Abb.1: Das „Single Strand Annealing“ (SSA) Modell der DNA-Rekombination. Die Reaktion ist nicht konservativ, d.h. aus zwei Rekombinationspartnern entsteht ein neues chimäres Molekül und Information geht verloren. Das Modell ist nicht nur geeignet, homologe Rekombinationsereignisse zwischen extrachromosomalen DNA-Molekülen in somatischen Pflanzenzellen zu erklären, es kann auch zur Erklärung von illegitimen Rekombinationsereignissen benutzt werden, bei denen beide Partner im Verknüpfungsbereich kurze Abschnitte gleicher Sequenzen aufweisen (siehe 4.2.).

Wir konnten unsere Erkenntnisse zum Mechanismus der extrachromosomalen Rekombination auch anwenden, um eine für ein Jahrzehnt ungelöste Frage der Pflanzenmolekularbiologie zu beantworten, ob nämlich *Agrobacterium tumefaciens* (Übersichtsartikel Tinland, 1996; Rossi *et al.*, 1996) bei der natürlichen Pflanzentransformation einen Doppel- oder Einzelstrang als T-DNA in den Zellkern transferiert: Während die Orientierung von zwei überlappenden, nicht funktionellen Hälften des β -Glucuronidasegens im Falle eines transferierten Doppelstrang für die homologe Rekombinationseffizienz keine Rolle spielen sollte, müßte bei einem Einzelstrang eine inverse Orientierung der überlappenden Bereiche zur direkten Basenpaarung („Single Strand Annealing“) führen und so eine wesentlich höhere Rekombinationseffizienz bedingen als das Konstrukt mit gleichsinniger Orientierung. Dies war tatsächlich der Fall und so konnte durch das extrachromosomale Rekombinationsverhalten der T-DNA nachgewiesen werden, daß ein Einzelstrang vom Bakterium in die Pflanzenzelle transferiert wird (Tinland *et al.*, 1994 [11]). Parallel dazu wurde das Ergebnis durch biochemische Analysen einer anderen Arbeitsgruppe erhärtet (Yusibov *et al.*, 1994).

3.2. Intrachromosomale Rekombination

Erste Untersuchungen zur intrachromosomalen Rekombination in Pflanzen wurden - wie bei der extrachromosomalen Rekombination - mit Hilfe von nicht-funktionellen, überlappenden Teilen von Selektionsmarkergenen (Peterhans *et al.*, 1990; Assaad and Signer, 1992; Tovar and Lichtenstein, 1992) oder mit einem viralen Replikon durchgeführt (Gal *et al.*, 1991; Swoboda *et al.*, 1993). Dabei wurden Rekombinationsfrequenzen von 10^{-4} bis 10^{-7} Ereignissen pro Zellteilung gefunden. Im Zuge unserer Arbeiten wurde ein alternatives System etabliert, bei dem überlappende Teile eines nicht-funktionellen β -Glucuronidasegens ins Pflanzengenom integriert wurden. Bei einem homologen Rekombinationsereignis wurde die codierende Sequenz des Markergens restauriert, das Rekombinationsereignis konnte histochemisch als blauer Sektor im Pflanzengewebe nachgewiesen werden. So konnten wir intrachromosomale Rekombination sowohl in ganzen *Arabidopsis*- (Swoboda *et al.*, 1994 [12]) als auch Tabakpflanzen (Puchta *et al.*, 1995a [13], 1995b [14]) untersuchen. Diese Methode wird inzwischen für vielfältige Analysen verwenden - so für die Charakterisierung

von verändertem Rekombinationsverhalten in Pflanzen (Shalev *et al.*, 1999) oder als Markerpflanze für radioaktive (Kovalchuk *et al.*, 1999) oder UV Strahlung (Ries *et al.*, 1999).

Pflanzengenome verfügen über große Mengen repetitiver DNA. Es ist also nicht verwunderlich, daß die homologe Rekombination zwischen gleichen Sequenzen im Pflanzengenom - im Gegensatz zu kleingenomigen Organismen wie Bakterien oder Hefe - nicht sehr effizient abläuft. Was ist aber die biologische Funktion der homologen Rekombination im somatischen Gewebe? Unsere Untersuchungen an ganzen Pflanzen haben gezeigt, daß die Rekombination in verschiedenen somatischen Geweben mit ähnlichen Frequenzen stattfindet (Swoboda *et al.*, 1994 [12]). Werden Pflanzenzellen mit Agentien oder Strahlen behandelt, die DNA schädigen, so kommt es jedoch zu einer starken Erhöhung der Rekombinationsfrequenz (Puchta *et al.*, 1995a [13], 1995b [14] siehe auch Tovar und Lichtenstein, 1992; Lebel *et al.*, 1993). Homologe Rekombination ist also für somatische Zellen ein Weg, DNA-Schäden, d.h. letztendlich Doppelstrangbrüche, zu reparieren.

Interessanterweise haben aber wir (Puchta *et al.*, 1995a [13]) und andere (Lebel *et al.*, 1993) auch Streßfaktoren, wie ein erhöhter Kochsalzgehalt im Medium oder Hitzeschock, gefunden, die ohne direkt die DNA zu schädigen, zu einer Erhöhung der homologen Rekombination führen können. Dies deutet an, daß die Induktion von Rekombinationsenzymen Teil einer natürlichen Stressantwort auf eine sich „negativ“ veränderte Umwelt sein könnte. Dafür spricht, daß die in dieser Arbeit hergestellten Pflanzen bei Pathogenbefall erhöhte Rekombinationsfrequenzen aufweisen (J. Lucht and B. Hohn, unpubliziertes Ergebnis). Auch wurde kürzlich eine *Arabidopsis*-Mutante charakterisiert, bei der eine verminderte Resistenz gegen genotoxischen Streß mit einem Defekt im Abscisinsäure-Signalweg gekoppelt war (Albinsky *et al.*, 1999). Diese Befunde sind eine weitere Bestätigung für die Hypothese von Barbara McClintock (1984), daß Pflanzen auf Streß mit Genomveränderungen reagieren können. Wichtig ist hierbei zu betonen, daß diese durch Streß aus der Umwelt hervorgerufenen somatischen Veränderungen durchaus in die Keimbahn gelangen können. Man kann sogar über eine Art „Lamarckismus“ spekulieren, da sich die neue genetische Information im Prinzip ja erst in somatischen Zellen bewähren muß (d.h. die Zellen überleben müssen), bevor sie in die Keimbahn übergeht (Walbot, 1985). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß pflanzliche Resistenzgene in tandemartige Genfamilien organisiert sind und es zu komplexen Austausch zwischen ihnen kommt, die dann zur Entstehung neuer Resistenzen führen können (Richter *et al.*, 1995; Parniske *et al.*, 1997).

4. Doppelstrangbruchreparatur (DSBR)

Wie oben diskutiert führen DNA-Schäden oft zu Doppelstrangbrüchen (DSBs). DSBs treten auch beim „Mating Type Switching“ von Hefe (Übersicht: Haber, 1998) und im Laufe der meiotischen Rekombination bei Eukaryonten auf (Übersicht: Roeder, 1997; Zickler and Kleckner, 1998). Um gezielt Rekombinationsvorgänge zu untersuchen - oder auch kontrolliert genomische Veränderungen vornehmen zu können - ist es notwendig, an bestimmten, definierten Stellen DSBs zu induzieren und somit nur an diesen Stellen spezifisch die Rekombination zu initiieren. Eine Möglichkeit dies zu erreichen ist die Verwendung von Transposons, da es bei ihrer Exzision aus dem Genom kurzzeitig zur Bildung von DSBs kommt. Dieser Vorgang wurde dann in einigen Arbeiten zur Analyse von DSB Reparaturprozessen in Pflanzen benutzt (Athma and Peterson, 1991; Lowe *et al.*, 1992; Shalev *et al.*, 1997). DNA kann jedoch auch an spezifischen Stellen mit Restriktionsendonukleasen geschnitten werden, ein Vorgang der täglich abertausendmal in vielen Laboratorien bei Genomanalysen und Klonierungen durchgeführt wird. Meist werden bei diesen Analysen Restriktionsenzyme mit relativ kurzen (4-mer oder 6-mer) spezifischen Erkennungssequenzen verwendet. Es gibt jedoch auch Enzyme, sogenannte „Homing“ Endonukleasen aus Organellgenomen, die wesentlich längere Erkennungssequenzen benötigen, so etwa das Enzym I-SceI aus Hefemitochondrien mit einer 18-mer Erkennungssequenz (Perrin *et al.*, 1993). Die Wahrscheinlichkeit, daß solch eine Sequenz natürlich im Genom vorkommt ist nicht allzu hoch, so kommt statistisch eine Erkennungsschnittstelle in ca. 4 Tabak- und 70 *Arabidopsis*-Genomen vor. Zur Analyse von DSB-induzierten Rekombinationsvorgängen werden deshalb in einem ersten Schritt Transgene, die eine artifizielle I-SceI Erkennungssequenz enthalten, im Zielgenom integriert. In den transgenen Organismen wird dann das Restriktionsenzym kurzzeitig exprimiert, um in der Zelle *in vivo* spezifisch an der Erkennungsstelle einen DSB zu erzeugen. Diese Technik wurde ursprünglich für Hefe entwickelt (Plessis *et al.*, 1992; Übersichtsartikel: Haber, 1995). Wir waren in der Lage zu zeigen, daß das System auch für höhere Eukaryonten geeignet ist (Puchta *et al.* 1993 [15]). Inzwischen findet die Technik nicht nur bei Pflanzen (Chiruzzi *et al.*, 1996; Puchta *et al.*, 1996 [16]; Puchta, 1998a [17], 1999a [19]; Salomon and Puchta 1998 [18]; Übersichtsartikel: Puchta 1999b [5], 1999c [6]; Gorbunova and Levy, 1999) sondern auch bei Säugern rege Anwendung (Ruoet *et al.*, 1994; Cholika *et al.*, 1994; Lukacsovich *et al.*, 1994; Smih *et al.* 1995; Liang *et al.*, 1996, 1998; Sargent *et al.*, 1997; Moynahan and

Jasin, 1997; Taghian and Nickoloff, 1997; Elliot *et al.*, 1998; Pipiras *et al.*, 1998; Donoho *et al.*, 1998; Cohen-Tannoudji *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1998; Übersichtsartikel: Jasin, 1996).

4.1. DSBR mittels homologer Rekombination

DSBs initiieren homologe Rekombinationsereignisse. Wird ein DSB an einer bestimmten Stelle im Pflanzengenom induziert, so steigt die homologe Rekombinationsfrequenz an dieser Stelle stark an (Athma and Peterson, 1991; Lowe *et al.*, 1992; Puchta *et al.*, 1996 [16]; Shalev *et al.*, 1997). Modelle zur Beschreibung homologer Rekombinationsvorgänge sollten demnach einen DSB in einem Rekombinationspartner (Akzeptor) aufweisen, der mittels der Sequenzinformation des zweiten als Matrize dienenden Partners (Donor) repariert wird. Das klassische Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) Modell zur Erklärung der homologen Rekombinationsreaktionen wurde zu Beginn der achtziger Jahre für meiotische Rekombinationsvorgänge in Hefe entwickelt (Szostak *et al.*, 1983) und danach auch zur Erklärung von Rekombinationsvorgängen in somatischen Zellen höherer Eukaryonten verwendet (siehe Abb. 2).

Das Modell postuliert, daß es gleichzeitig zur Interaktion von beiden DSB Enden mit homologen Sequenzen im Donormolekül kommt. Dies führt zur Ausbildung von sog. Doppel-„Holliday-Junctions“. Je nachdem wie diese Zwischenstrukturen aufgelöst werden, kann es zu einem Austausch von flankierenden Sequenzen, einem sogenannten „Crossover“ (im Bild die Kombination von schwarz auf der einen und grau auf der anderen Seite) oder einem Konversionsereignis kommen. „Crossover“ sind biologisch von größter Bedeutung, da sie bei der meiotischen Rekombination das väterliche und mütterliche Erbgut durchmischen. Unsere Untersuchungen zur Reparatur von DSBs in somatischen Tabakzellen haben jedoch gezeigt, daß das DSBR Modell in wesentlichen Punkten nicht mit den gefundenen Daten übereinstimmt. So wurden neben dem vom Modell vorhergesagten homologen Rekombinanten in einem Teil der Fälle Reparaturereignisse gefunden, bei denen ein Ende des DSBs mittels homologer und das andere mittels illegitimer Rekombination repariert wurde (Puchta *et al.*, 1996 [16]). Ähnliche Ergebnisse wurden in T4 Phagen (Formosa and Alberts, 1986) und in somatischen Zellen von *Ustilagus* (Ferguson and Holloman, 1996), *Drosophila* (Nassif *et al.*, 1994), Säugern (Belmaaza and Chartrand, 1994) und kürzlich Hefe (Holmes and Haber, 1999) gefunden, was zur Postulierung von Modellen führte, in denen die Invasion beider Enden unabhängig erfolgt, bzw. nur ein Ende des DSBs das Akzeptormolekül invasiert („Synthesis-Dependent Strand Annealing“ [SDSA] Modell bzw. „One-Sided Invasion“ [OSI] Modell).

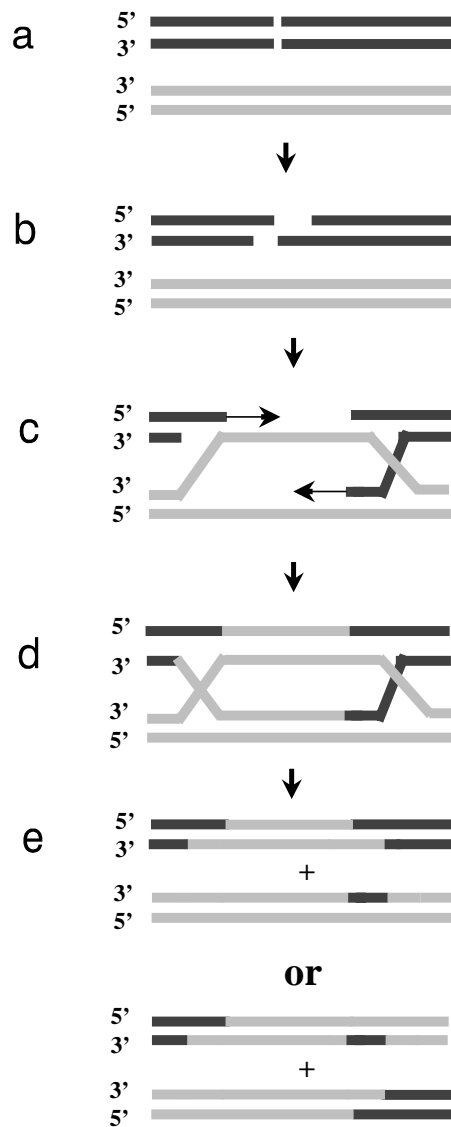


Abb.2: Das „Double Strand Break Repair“ (DSBR) Modell der DNA-Rekombination. Nach diesem Modell erfolgt an beiden Bruchenden homologe Reparatur, es kommt zur Ausbildung sogenannter „Holliday-Junctions“, die in einem Teil der Fälle so aufgelöst werden, daß es zu einem „Crossover“ kommt (e, unten). Zum anderen Teil entstehen Konversionen (Rekombination ohne Austausch flankierender Marker) (e, oben).

In Anwendung dieser Modelle wurde von mir eine experimentelle Situation bei Pflanzen geschaffen, in denen nur ein Ende des Bruchs mit homologer Rekombination repariert werden konnte. Die Ergebnisse zeigten, daß dieser Vorgang etwa halb so effizient war, wie bei der Anwesenheit beider Enden (Puchta, 1998a [17]). Es ist also prinzipiell möglich, DSB Reparaturereignisse durch unabhängige Interaktionen beider Bruchenden mit homologen Sequenzen zu erklären. Dies zeigt eindeutig, daß das DSBR Modell weit weniger geeignet ist,

homologe DSB-Reparatur in somatischen Pflanzenzellen zu beschreiben als eine Kombination aus den OSI und SDSA Modellen (Abb. 3).

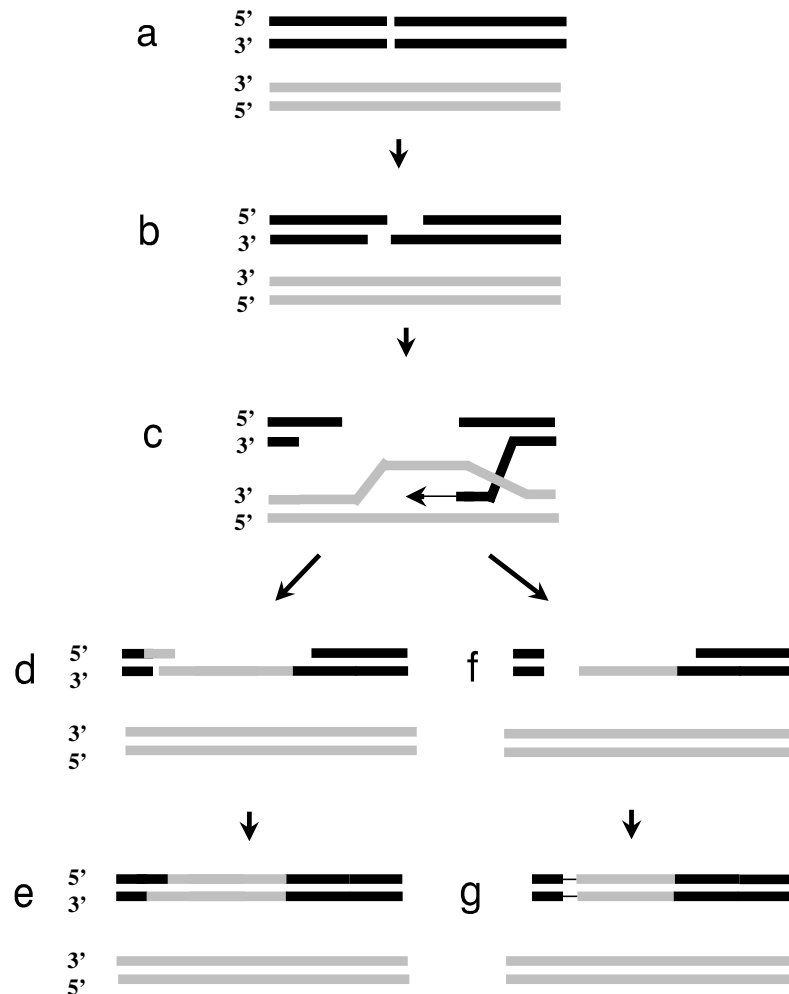


Abb.3: Eine Kombination aus „One Sided Invasion“ (OSI) and „Synthesis Dependent Strand Annealing“ (SDSA) Modellen zur Beschreibung von DSB Reparaturvorgängen in somatischen Pflanzenzellen. Nach diesem Modell kommt es zu einer einseitigen homologen Invasion eines Bruchendes, die beiden Enden nehmen unabhängig voneinander an der Reaktion teil. Somit ist die Reparatur des DSBs auch durch eine Kombination von homologer und illegitimer Rekombination (in e durch die dünnen schwarzen Striche gekennzeichnet) möglich. Bei diesen Modellen kommt es nicht zu „Crossover“-Ereignissen. Das Modell ist nicht nur geeignet homologe Rekombinationsereignisse zu erklären, es kann auch auf die Insertion von genomischen Sequenzen in Doppelstrangbrüche mittels illegitimer Rekombination benutzt werden. (siehe 4.2.).

Das Vorhandensein von OSI/SDSA Mechanismen hat weitreichende biologische Konsequenzen: Es kommt an der Bruchstelle im Genom durch die Kombination von homologer und illegitimer Rekombination öfter zu genomischen Veränderungen als bisher

angenommen. Pflanzen weisen teilweise sehr große Genome mit einem hohen Anteil an repetitiver DNA auf. Obwohl nach meinen Ergebnissen (Puchta, 1999a [19]) somatische Rekombinationsereignisse zwischen diesen Sequenzen nur sehr selten vorkommen, würden diese, wenn sie nach dem DSBR Model ablaufen würden, durch „Crossover“-Ereignisse zwischen verschiedenen Chromosomen zu Chromosomenaberrationen und damit zu einer Instabilisierung des Pflanzengenoms führen. Da Reparaturvorgänge nach den OSI/SDSA Mechanismen nicht zu „Crossover“-Ereignissen führen (wie in Abb. 3 gezeigt), ist - mit in Inkaufnahme von kleineren Veränderungen an der Bruchstelle - die Stabilität auf der Genomebene in somatischen Zellen gewährleistet. So konnte ich auch bei der Charakterisierung der DSB-induzierten, interchromosomalen Rekombinationsereignissen keine „Crossover“-Ereignisse finden (Puchta, 1999a [19]). Zu ähnlicher Ergebnissen kam auch eine parallele Studie in tierischen Zellen (Richardson *et al.*, 1998).

4.2. DSBR mittels illegitimer Rekombination

Illegitime Rekombination ist Hauptverknüpfungsart von DNA-Molekülen in höheren Eukaryonten. Eine große Anzahl von Studien zur illegitimen Rekombination wurde in Säugerzellen (Übersichtsartikel: Roth and Wilson, 1988) aber auch in *Xenopus* Oozyten (z.B. Lehman *et al.*, 1994, Pfeiffer *et al.*, 1994) durchgeführt. Illegitime Rekombination in Pflanzen wurde meist mittels Integration von Transgenen, vor allem T-DNAs untersucht (Matsumoto *et al.*, 1990; Mayerhofer *et al.*, 1991; Gheysen *et al.*, 1991; Hiei *et al.*, 1994; Ohba *et al.*, 1995; Papp *et al.*, 1996; Iglesias *et al.*, 1997; Takano *et al.*, 1997; Krizkova and Hroudá, 1998; Kohli *et al.*, 1999; Übersicht; Tinland 1996). Außerdem wurden Studien zur extrachromosomalen Rekombination zwischen Plasmidsequenzen (De Groot *et al.*, 1994; Gorbunova and Levy, 1997), zur Zirkularisierung von extrachromosomalen T-DNAs (Bakkeren *et al.*, 1989) und Deletionen an spezifischen Stellen im Pflanzengenom (Wessler *et al.*, 1990; Shirley *et al.*, 1992) durchgeführt. Zu welchen genomischen Veränderungen aber kann es bei einer illegitimen Rekombinationsreparatur eines genomischen DSB kommen? Um diese Frage zu beantworten etablierten wir (Salomon and Puchta, 1998 [18]) ein Assaysystem, mit dem DSB-Reparatur im Genom verfolgt werden konnte. Dabei wurde zwischen Promotor und kodierender Region eines negativen Selektionsmarkers eine I-SceI-Schnittstelle integriert. Nach Induktion des DSB mittels I-SceI konnten Genomveränderung, die zur Zerstörung des

Reportergens führten, analysiert werden. Wir fanden, wie in den bereits zitierten Studien, daß prinzipiell der DSB auf zwei Arten neu verknüpft werden kann: einerseits durch eine Art „Single Strand Annealing“ (Siehe Abb. 1) bei dem kurze Homologien von wenigen Basenpaaren bei den Reaktionspartnern zur Verknüpfung benutzt werden (Mason *et al.*, 1996; Nicolas *et al.*, 1995) und andererseits durch Ligation bei der die Sequenz der Partner keine Rolle spielt. Überraschenderweise fanden wir, daß es neben dem Verlust von genetischer Information auch in einer Reihe von Fällen zu Insertionen, d.h. zum Einbau „neuer“ Sequenzen in den Bruch, kommen kann (siehe auch Rubin and Levy, 1997; Gorbunova and Levy, 1997). Die insertierten Sequenzen kommen an anderen (nicht-homologen) Orten im Genom vor und werden im Verlauf des Reparaturprozesses in den Bruch kopiert. Dabei scheint das „Synthesis-Dependent Strand Annealing“ Modell (Abb. 3) gut geeignet zu sein, diesen Reparaturvorgang zu beschreiben. Es konnten Insertionen von verschiedenen repetitiven Sequenzen (Subtelomer-repeats, Retrotransposon-ähnliche Sequenzen) aber auch von unikaligen Sequenzen aus Genbereichen gefunden werden (Salomon and Puchta, 1998 [18]). Die entscheidende Aussage ist: auf dem Wege der DSB-Reparatur kann prinzipiell jede Sequenz an einer neuen Position ins Pflanzengenom eingefügt werden. Bislang galt die Auffassung, daß nur Sequenzen, die entweder selbst für Transposasen bzw. Integrasen codieren oder zumindest Erkennungssequenzen für diese Enzyme enthalten (funktionelle und nicht-funktionelle Transposons bzw. Retrotransposons) an neue Positionen im Genom springen können (Teng *et al.*, 1996; Moore and Haber, 1996). Unser Befund, daß DSB-Reparatur mit Deletions- und/oder Insertionsereignissen verbunden sein kann, zeigt neue Mechanismen für die Evolution pflanzlicher Genome auf, da wie schon erwähnt entsprechende Veränderungen in meristematischen oder Keimbahnzellen an die nächste Generation vererbt werden können. Unter der Annahme, daß exonukleolytischer Abbau im Rahmen der illegitimen Rekombination dominiert, ist im evolutionären Maßstab eine Genomverkleinerung vorstellbar (Petrov, 1997), die zum weitgehenden Verlust repetitiver Sequenzen führt, bzw. die Neubildung solcher [z.B. durch die Expansion von Retroelementen (Bennetzen and Kellog, 1997; San Miguel *et al.*, 1996, 1998)] kompensiert. Andererseits hätte eine mögliche leichte Bevorzugung von Insertionen in evolutionären Zeiträumen eine stete Vergrößerung der betroffenen Genome zur Folge. Letzteres böte - solange die neue „Bürde“ energetisch toleriert werden kann - auch neue Optionen für die Evolution von Genen an, entsprechend der Theorie von Susumo Ohno (1970) wonach neue Gene aus Duplikaten vorhandener Sequenzen entstehen können. Damit liegt neben der Expansion von

Retroelementen, dem „Replikation slippage“ und dem ungleichen „Crossover“ ein prinzipiell neuer möglicher Mechanismus zur Vergrößerung von Genomen vor. Die Experimente wurden von uns an Tabak, einer Pflanze mit mittlerer Genomgröße durchgeführt. Hier wurde ein leichtes Übergewicht von Deletionen bei der DSB-Reparatur gefunden. Derzeit werden ähnliche Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana*, einer Pflanze mit sehr kleinem Genom, begonnen. Es ist dabei von besonderem Interesse, ob im *Arabidopsis*-Genom die gleichen Phänomene mit ähnlicher Frequenz auftreten, oder möglicherweise Deletionsereignisse sehr viel stärker bevorzugt werden.

Es können jedoch nicht nur genom-eigene Sequenzen in einen DSB inseriert werden: In den beschriebenen Experimenten (Salomon and Puchta, 1998 [18]) wurden auch T-DNA Moleküle, die zur Expression von I-SceI von *Agrobacterium tumefaciens* in die Pflanzen transferiert wurden, in die Schnittstelle integriert. Es konnte damit erstmals gezeigt werden, daß Transgene über DSBs mit dem Genom verknüpft werden können. Dies ist eigentlich nicht überraschend, da bei jeder stabilen Transformation genomische mit transgenen DNA-Enden neu verknüpft werden müssen. Frühere Ergebnisse, daß radioaktive (d.h. DSB-induzierende) Strahlung die Transformationsfrequenz von Tabak-Protoplasten erhöhen kann (Köhler *et al.*, 1989), deuteten bereits in diese Richtung. Erklärbar wird durch unsere Ergebnisse auch, daß bei der Charakterisierung von Transgenen im Pflanzengenom kürzlich Fälle gefunden wurden, in denen sich abwechselnd transgene und genomische Sequenzen am Integrationslocus aneinanderreihen (siehe z.B. Kohli *et al.*, 1998; Jakowitsch *et al.*, 1999). Auch in diesen Fällen scheinen die unterschiedlichen Sequenzen mittels des SDSA Mechanismus in den Locus kopiert worden zu sein. Es bleibt der zukünftigen Forschung vorbehalten, ob und in wie weit man DSB-vermittelte Integration von Transgenen auch für gentechnologische Anwendungen bei Pflanzen verwenden kann, ähnlich wie die sequenzspezifische Rekombinasen-vermittelte Integration (Albert *et al.*, 1995; Vergunst *et al.*, 1998; Vergunst and Hooykaas, 1998).

5. Ausblick

Die durchgeführten Arbeiten konzentrierten sich auf die Charakterisierung grundlegender Rekombinationsvorgänge in somatischen Pflanzenzellen. Obwohl hierbei große Fortschritte erzielt wurden, bleiben doch einige wichtige Fragen offen, die wir zur Zeit in der

Arbeitsgruppe DNA-Rekombination mit dem hier beschriebenen Material zu beantworten versuchen. So soll geklärt werden, ob bei der DSB Reparatur auch allelische Sequenzen vom homologen Chromosom verwendet werden können. Weiterhin untersuchen wir das Verhältnis von homologer und illegitimer Rekombination bei der DSB Reparatur, wenn in der Umgebung des Bruches homologe Sequenzen vorhanden sind. Auch soll versucht werden mittels spezifischer Expression der I-SceI Restriktionsendonuclease während der Meiose spezifisch meiotische Rekombination zu induzieren. Und schließlich soll durch einen Vergleich von Tabak mit der kleingenomigen Modellpflanze *Arabidopsis* geklärt werden, ob die Art der DSB Reparatur bei verschiedenen Pflanzen verschieden ist und eventuell von der Genomgröße beeinflusst wird.

Neben der weiteren Charakterisierung möglicher Rekombinationswege ist es jedoch von außerordentlicher Wichtigkeit, die Faktoren, die in diese Vorgänge involviert sind zu identifizieren. Auf der einen Seite geschieht dies durch Suche über Sequenzhomologien in Datenbanken. In Bakterien, Hefen und in letzter Zeit auch verstärkt bei Säugern konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, deren Produkte bei DNA-Rekombinationsvorgängen eine Rolle spielen (Übersicht: z.B. Lieber *et al.*, 1997). Die baldige Aufklärung der vollständigen Sequenz des *Arabidopsis*-Genoms läßt diesen Ansatz auch bei Pflanzen große Bedeutung gewinnen. Wir haben aus den bereits vorhandenen Sequenzen eine größere Anzahl homologer Sequenzen identifiziert und teilweise kloniert (Hartung and Puchta, unpubliziert). Andererseits wird es immer klarer, daß auch eine größere Anzahl von in DNA-Rekombination involvierte Faktoren nicht eindeutig über Sequenzhomologien identifiziert werden können. Jedoch sollte eine Identifizierung der entsprechenden Gene durch ihre Expressionseigenschaften möglich sein. So ist die Expression von an Rekombinationsvorgängen beteiligter Proteine sowohl im meiotischen Gewebe als auch nach Induktion von DNA-Schäden besonders hoch. Es sollte also möglich sein, durch das substraktive „Screenen“ von Filter-“Arrays“ von cDNA-Banken der entsprechenden Gewebe weitere an Rekombinationsvorgängen beteiligte Faktoren zu finden. Nach Isolierung von Insertionsmutanten bzw. nach Herstellung transgener Linien mit „Antisense“-Induktion sollte es mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Assaysysteme gelingen, den Einfluß einzelner Faktoren auf die verschiedenen Rekombinationswege zu ermitteln. Eine spezifische Beeinflussung homologer und illegitimer Rekombination durch das Abschalten von spezifischen Genen sollte uns in die Lage versetzen bei höheren Pflanzen die „Gene Targeting“ Technik zu etablieren. Auch sollte eine Erhöhung der meiotischen Rekombination

zwischen homologen bzw. homöologen Sequenzen den Austausch von Genbereichen bzw. die Kreuzbarkeit von nahe verwandten Arten deutlich beeinflussen.

Aber auch Fragestellungen, die für die gentechnologische Anwendung von Wichtigkeit sind, sind Teil unseres Arbeitsprogramms: Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease I-SceI versuchen wir zur Zeit die zur Transformation verwendeten Selektionsmarkergene wieder aus dem Pflanzengenom herauszuschneiden. Derselbe Ansatz könnte auch dazu verwendet werden, bei Pflanzen, die mehrere in Tandem angeordnete Transgen-Sequenzen enthalten, überschüssige Transgen-Kopien zu eliminieren und so Linien mit nur einer Transgenkopie zu erhalten, bei denen dann kaum „Gene Silencing“ Effekte zu erwarten sind (Übersicht: Matzke and Matzke, 1998)

Es bleibt zu hoffen, daß wir mit wachsendem Verständnis molekularer Rekombinationsvorgänge in Pflanzen mehr und mehr in der Lage sein werden, kontrolliert und sicher Veränderungen im Pflanzengenom vorzunehmen, die nicht nur zu einer Verbesserung der landwirtschaftlichen Produktivität, sondern auch zu einer größeren Akzeptanz gentechnologischer veränderter Pflanzen in der europäischen Öffentlichkeit führen werden.

6. Literaturverzeichnis

- Albert H., Dal E.C., Lee E., and Ow D.W. (1995) Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant *lox* sites placed in the plant genome. *Plant J.* **7**, 649-659.
- Albinsky D., Masson J.E., Bogucki A., Afsar K., Vass I., Nagy F. and Paszkowski J. (1999) Plant responses to genotoxic stress are linked to an ABA/salinity signaling pathway. *Plant J.* **17**, 73-82.
- Alexeev V. and Yoon K. (1998) Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide *Nat. Biotechnol.* **13**, 1343-1346
- Assaad F. A. and Signer E. R. (1992) Somatic and germinal recombination of a direct repeat in *Arabidopsis*. *Genetics* **132**, 553-566.
- Athma P. and Peterson T. (1991) Ac induces homologous recombination at the maize P locus. *Genetics* **128**, 163-173.
- Bakkeren G., Koukolikova-Nicola Z., Grimsley N. and Hohn B. (1989) Recovery of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA molecules from whole plants early after transfer. *Cell* **57**, 847-857.
- Baur M., Potrykus I. and Paszkowski J. (1990) Intermolecular homologous recombination in plants. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 492-500.
- Beetham P.R., Kipp P.B., Sawycky X.L., Arntzen C.J. and May G.D. (1999) A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8774-8778.

- Belmaaza A. and Chartrand P. (1994) One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mut. Res.* **314**, 199-208.
- Bennetzen J.L. and Kellog E.A. (1997) Do plants have a one-way ticket to the genomic obesity? *Plant Cell* **9**, 1509-1514.
- Bilang R., Peterhans A., Bogucki A. and Paszkowski J. (1992) Single-stranded DNA as recombination substrate in plants assessed by stable and transient expression. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 329-336.
- Camerini-Otero R.D. and Hsieh P. (1995) Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 509-552.
- Chiurazzi M., Ray A., Viret. J.-F., Perera R., Wang X.-H., Lloyd A. and Signer E.R. (1996) Enhancement of somatic intrachromosomal homologous recombination in Arabidopsis by HO-endonuclease. *Plant Cell* **8**, 2057-2066.
- Choulika A., Perrin A., Dujon B. and Nicolas J.-F. (1995) Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1968-1973.
- Cohen-Tannoudji M., Robine S., Choulika A., Pinto D., El Marjou F., Babinet C., Louvard D. and Jaisser F. (1998) I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1444-1448.
- Cole-Strauss. A., Gamper, H., Holloman W.K., Munoz, M., Cheng, N. & Kmiec, E.B. (1999) Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1323-1330.
- Cole-Strauss A., Yoon K., Xiang Y., Byrne B.C., Rice M.C., Gryn J., Holloman W.K. and Kmiec E.B. (1996) Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* **273**, 1386-1389
- Das P.O., Levi-Minzi S., Koury M., Benner M., and Messing J. (1990) A somatic gene rearrangement contributing to genetic diversity in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7809-7813.
- De Groot M.J.A., Offringa R., Does M.P., Hooykaas P.J.J. and van den Elzen, P.J.M. (1992) Mechanisms of intermolecular homologous recombination in plants as studied with single- and double-stranded DNA molecules. *Nucl. Acids Res.* **20**, 2785-2794.
- De Groot M.J., Offringa R., Groet J., Does M.P., Hooykaas P.J. and van den Elzen P.J. (1994) Non-recombinant background in gene targeting: illegitimate recombination between a hpt gene and a defective 5' deleted nptII gene can restore a Kmr phenotype in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **25**, 721-733.
- Doetschman T., Gregg R.G., Maeda N., Hooper M.L., Melton D.W., Thompson S. and Smithies O. (1987) Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* **330**, 576-578.
- Donoho G., Jasin M. and Berg P. (1998) Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4070-4078.
- Elliott B., Richardson C., Winderbaum J., Nickoloff J.A. and Jasin M. (1998) Gene Conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 93-101.
- Ferguson D.O. and Holloman W.K. (1996) Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5419-5424.
- Fishman-Lobell J., Rudin N. and Haber J.E. (1992) Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol.* **12**, 1292-1303.

- Formos T. and Alberts B.M. (1986) DNA synthesis dependent on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 proteins. *Cell* **47**, 793-806.
- Gal S., Pisan B., Hohn T., Grimsley N. and Hohn B. (1991) Genomic homologous recombination in planta. *EMBO J.* **10**, 1571-1578.
- Gallego M.E., Sirand-Pugnet P. and White C.I. (1999) Positive-negative selection and T-DNA stability in Arabidopsis transformation *Plant Mol. Biol.* **39**, 83-93.
- Gheysen G., Villarroel R. and Van Montagu M. (1991) Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev.* **5**, 287-297.
- Gorbunova V. and Levy A.A.(1997) Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4650-4657.
- Gorbunova V. and Levy A.A.(1999) How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. *Trends Plant Sci.* **4**, 263-269.
- Haber J.E. (1995) In vivo biochemistry: Physical monitoring of recombination induced by site-specific endonucleases. *Bioassays* **17**, 609-620.
- Haber J.E. (1998) Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 561-599.
- Halfter U., Morris P. C., and Willmitzer L. (1992) Gene targeting in Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 186-193.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T. and Kumashiro T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6**, 271-282.
- Hohn B. and Puchta H. (1999) Gene therapy in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8321-8323.
- Holmes A.M. and Haber J.E. (1999) Double-strand break repair in yeast requires both leading and lagging strand DNA polymerases. *Cell* **96**, 415-424.
- Hrouda M. and Paszkowski J. (1994) High fidelity extrachromosomal recombination and gene targeting in plants. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 106-111.
- Iglesias V.A., Moscone E.A., Papp I., Neuhuber F., Michalowski S., Phelan T., Spiker S., Matzke M.A. and Matzke A.J. (1997) Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* **9**, 1251-1264.
- Jakowitsch J., Papp I., Moscone E.A., van der Winden J., Matzke M. and Matzke A.J. (1999) Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J.* **17**, 131-140.
- Jasin M. (1996) Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.* **12**, 224-228.
- Jasin M., Moynaham M.E. and Richardson C. (1996) Targeted transgenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8804-8808.
- Kempin S.A., Liljegren S.J., Block L.M., Rounsley S.D., Yanofsky M.F. and Lam E. (1997) Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature* **389**, 802-803.
- Köhler F., Cardon G., Pöhlman M., Gill R. and Schieder O. (1989) Enhancement of transformation rates in higher plants by low-dose irradiation: Are DNA repair systems involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome? *Plant Mol. Biol.* **12**, 189-199.
- Kohli A., Griffiths S., Palacios N., Twyman R.M., Vain P., Laurie D.A. and Christou P. (1999) Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant J.* **17**, 591-602.

- Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D.A. and Christou P. (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7203-7208.
- Kovalchuk I., Kovalchuk O., Arkhipov A. and Hohn B. (1998) Transgenic plants are sensitive bioindicators of nuclear pollution caused by the Chernobyl accident. *Nature Biotechnol.* **11**, 1054-1059.
- Krizkova L. and Hroudá M. (1999) Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions. Krizkova L. and Hroudá M. *Plant J.* **16**, 673-681.
- Leach D.R.F. (1996) Genetic Recombination. Blackwell Science, Oxford
- Lebel E.G., Masson J., Bogucki A. and Paszkowski J. (1993) Stress-induced intrachromosomal recombination in plant somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 422-426.
- Lee K. Y., Lund P., Lowe K. and Dunsmuir P. (1990) Homologous recombination in plant cells after Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell* **2**, 415-425.
- Lehman C.W., Trautman J.K. and Carroll D. (1994) Illegitimate recombination in *Xenopus*: characterization of end-joined junctions. *Nucleic Acids Res.* **22**, 434-442.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5172-5177.
- Liang F., Romanienko P.J., Weaver D.T., Jeggo P.A. and Jasin M. (1996) Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8929-8933.
- Lieber M.R., Grawunder U., Wu X. and Yaneva M. (1997) Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 99-104.
- Lin F.-L., Sperle K. and Sternberg N. (1984) Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: Role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1020-1034.
- Lin F.-L., Sperle K. and Sternberg N. (1990) Intermolecular recombination between DNAs introduced into mouse L cells is mediated by a nonconservative pathway that leads to crossover products. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 103-112.
- Lowe B., Mathern J. and Hake S. (1992) Active Mutator elements suppress the knotted phenotype and increase recombination at the Kn1-O tandem duplication. *Genetics* **132**, 813-822.
- Lukacsovich T., Yang D. and Waldman A.S. (1994) Repair of a specific double-strand break generated within a mammalian chromosome by yeast endonuclease I-SceI. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5649-5657.
- Lyznik L.A., McGee J.D., Tung P.-T., Bennetzen J.L. and Hodges, J.K. (1991) Homologous recombination between plasmid DNA molecules in maize protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 209-218.
- Maryon E., and Carroll D. (1991a) Involvement of single-stranded tails in homologous recombination of DNA injected into *Xenopus laevis* oocyte nuclei. *Mol. Cell. Biol.* **11** 3268-3277.
- Maryon E. and Carroll D. (1991b) Characterization of recombination intermediates from DNA injected into *Xenopus laevis* oocytes: Evidence for a nonconservative mechanism of homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3268-3277.
- Mason R.M., Thacker J. and Fairman M.P. (1996) The joining of non-complementary DNA double-strand breaks by mammalian extracts. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4946-4953.

- Masson J.E. and Paszkowski J. (1997) *Arabidopsis thaliana* mutants altered in homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11731-11735.
- Matsumoto S., Ito Y., Hosoi T., Takahashi Y. and Machida Y. (1990) Integration of *Agrobacterium* T-DNA into a tobacco chromosome: possible involvement of DNA homology between T-DNA and plant DNA. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 309-316.
- Matzke A.J. and Matzke M.A. (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 142-148.
- Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Bakkeren G., Cramer A., Angelis K., Redei G., Schell J., Hohn B. and Koncz C. (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.* **10**, 271-280.
- McClintock B. (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science* **226**, 792-801.
- Miao Z.-H. and Lam E. (1995) Targeted disruption of the *TGA3* locus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **7**, 359-365.
- Mosig G. (1998) Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 379-413.
- Moore J.K. and Haber J.E. (1996) Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks. *Nature* **383**, 644-646.
- Moynahan M.E. and Jasin M. (1997) Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8988-8993.
- Nassif N., Penny J., Pal S., Engels W.R. and Gloor G.B. (1994) Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element induced gap repair, *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1613-1625.
- Nicolas A.L., Munz P.L. and Young C.S. (1995) A modified single-strand annealing model best explains the joining of DNA double-strand breaks in mammalian cells and cell extracts. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1036-1043.
- Offringa R., de Groot M.J.A., Haagsman H.J., Does M.P., van den Elzen P.J.M. and Hooykaas P.J.J. (1990) Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after *Agrobacterium* mediated transformation. *EMBO J.* **9**, 3077-3084.
- Offringa R., Franke-van Dijk M. E. I., de Groot M. J. A., van den Elzen P. J. M. and Hooykaas P. J. J. (1993) Nonreciprocal homologous recombination between *Agrobacterium* transferred DNA and a plant chromosomal locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7346-7350.
- Ohba T., Yoshioka Y., Machida C. and Machida Y. (1995) DNA rearrangement associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example for multiple duplications of DNA around the integration target. *Plant J.* **7**, 157-164.
- Ohno S. (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer, Berlin
- Papp I., Iglesias V.A., Moscone E.A., Michalowski S., Spiker S., Park Y.D., Matzke M.A. and Matzke A.J. (1996) Structural instability of a transgene locus in tobacco is associated with aneuploidy. *Plant J.* **10**, 469-478.
- Parniske M., Hammond-Kosack K.E., Golstein C., Thomas C.M., Jones D.A., Harrison K., Wulff B.B. and Jones J.D. (1997) Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. *Cell* **91**, 821-832.
- Paszkowski J., Baur M., Bogucki A., and Potrykus I. (1988) Gene targeting in plants. *EMBO J.* **7**, 4021-4026.
- Perrin A., Buckle M. and Dujon B. (1993) Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions. *EMBO J.* **12**, 2939-2947.
- Peterhans A., Schlüpmann H., Basse C. and Paszkowski J. (1990) Intrachromosomal recombination in plants. *EMBO J.* **9**, 3437-3445.

- Petrov D. (1997) Slow but steady: Reduction of genome size through biased mutation. *Plant Cell* **9**, 1900-1901.
- Pfeiffer P., Thode S., Hancke J. and Vielmetter W. (1994) Mechanisms of overlap formation in nonhomologous DNA end joining. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 888-895.
- Pipiras E., Coquelle A., Bieth A. and Debatisse M. (1998) Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *EMBO J.* **17**, 325-333.
- 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.
- Puchta H. (1999a) DSB-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics*, **152**, 1173-1181.
- Puchta H. (1999b) Doppelstrangbruchreparatur und Genomevolution bei Pflanzen. *Biospektrum* **5**, 105-108.
- Puchta H. (1999c) Use of I-SceI to induce double-strand breaks in *Nicotiana*. In "DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems", Methods in Molecular Biology, D.S. Henderson Edt., Humana Press, New Jersey, 447-451.
- Puchta H. (1998a) Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. *Plant J.* **13**, 331-339.
- Puchta H. (1998b) Towards targeted transformation in plants. *Trends Plant Sci.* **3**, 77-78.
- Puchta H., Dujon B. and Hohn B. (1993) Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double-strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucl. Acids Res.* **21**, 5034-5040.
- Puchta H., Dujon B. and Hohn B. (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5055-5060.
- Puchta H. and Hohn B. (1991a) A transient assay in plant cells reveals a positive correlation between extrachromosomal recombination rates and length of homologous overlap. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2693-2700.
- Puchta H. and Hohn B. (1991b) The mechanism of extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 1-7.
- Puchta H. and Hohn B. (1996) From centiMorgans to basepairs: Homologous recombination in plants. *Trends in Plant Sci.* **1**, 340-348.
- Puchta H., Kocher S. and Hohn B. (1992) Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells is fast and is not affected by CpG methylation. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3372-3379.
- Puchta H. and Meyer P. (1994) Substrate specificity of plant recombinases determined in extrachromosomal recombination systems. In Paszkowski J. (ed.) Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 123-155.
- Puchta H., Swoboda P. and Hohn B. (1994) Homologous recombination in plants. *Experientia* **50**, 277-284.
- Puchta H., Swoboda P. and Hohn B. (1995a) Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *Plant J.* **7**, 203-210.
- Puchta H., Swoboda P., Gal S., Blot M. and Hohn B. (1995b) Intrachromosomal homologous recombination events in populations of plant siblings. *Plant Mol. Biol.*, **28**, 281-292.
- Reiss B., Klemm M., Kosak H. and Schell J. (1996) RecA protein stimulates homologous recombination in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3094-3098.
- Reski R. (1998) Physcomitrella and Arabidopsis: the David and Goliath of reverse genetics. *Trends Plant Sci.* **3**, 209-210.

- Richardson C., Moynahan M.E. and Jasin M. (1998) Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev.* **12**, 3831-3842.
- Richter T.E., Pryor T.J., Bennetzen J.L. and Hulbert S.H. (1995) New rust resistance specificities associated with recombination in the Rp1 complex in maize. *Genetics* **141**, 373-381.
- Ries G., Heller W., Puchta H., Sandermann H.J., Seidlitz H.K. and Hohn B. (1999) Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants, submitted.
- Risseuw E., Franke-van Dijk M.E. and Hooykaas P.J. (1997) Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome. *Plant J.* **11**, 717-728.
- Risseuw E., Offringa R., Franke-van Dijk M. E. and Hooykaas P. J. (1995) Targeted recombination in plants using *Agrobacterium* coincides with additional rearrangements at the target locus, *Plant J.* **7**, 109-119.
- Roeder G.S. (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* **11**, 2600-2621.
- Rossi L., Tinland B. and Hohn B. (1996) Role of the virulence protein of *Agrobacterium tumefaciens* in the plant cell. In: Spaink, H., Hooykaas, P. and Kondorosi, A. (eds.) *The Rhizobiaceae*. Kluwer, Dordrecht, pp. 303-320.
- Roth D.B. and Wilson J.H. (1988) Illegitimate recombination in mammalian cells. In *Genetic recombination*, R. Kucherlapati and G.R. Smith Edts., American Society of Microbiology, Washington, USA. pp. 621-635.
- Rouet P., Smih F. and Jasin M. (1994) Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5012-5019.
- Rubin E., and Levy A. A. (1997) Abortive gap repair: The underlying mechanism for *Ds* elements formation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6294-6302.
- Salomon S. and Puchta H. (1998) Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells *EMBO J.* **17**, 6086-6095.
- SanMiguel P., Gaut B.S., Tikhonov A., Nakajima Y. and Bennetzen J.L. (1998) The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nature Genetics* **20**, 43-45.
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., Springer P.S., Edwards K.J., Lee M., Avramova Z. and Bennetzen J.L. (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**, 765-768.
- Sargent R.G., Breneman M.A. and Wilson J.H. (1997) Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 267-277.
- Schaefer D.G. and Zryd J.P. (1997) Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **11**, 1195-1206.
- Shalev G. and Levy A.A. (1997) The maize transposable element *Ac* induces recombination between the donor site and an homologous ectopic sequence. *Genetics* **146**, 1143-1151.
- Shalev G., Sitrit Y., Avivi-Ragolski N., Lichtenstein C., and Levy A.A. (1999) Stimulation of homologous recombination in plants by expression of the bacterial resolvase RuvC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7398-7402.
- Shirley B.W., Hanley S. and Goodman H.M. (1992) Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *Plant Cell* **4**, 333-347.
- Smih F., Rouet P., Romanienko P.J. and Jasin M. (1995) Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 8096-8106.
- Strepp R., Scholz S., Kruse S., Speth V., Reski R. (1998) Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4368-4373.

- Swoboda P., Gal S., Hohn B. and Puchta H. (1994) Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *EMBO J.* **13**, 484-489.
- Swoboda P., Hohn B., and Gal S. (1993) Somatic homologous recombination in planta: The recombination frequency is dependent on the allelic state of recombining sequences and may be influenced by genomic position effects. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 33-40.
- Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R.J. and Stahl F.W. (1983) The double-strand break repair model of recombination. *Cell* **33**, 25-35.
- Taghian D.G. and Nickoloff J.A. (1997) Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6386-6393.
- Takano M., Egawa H., Ikeda J.E. and Wakasa K. (1997) The structures of integration sites in transgenic rice. *Plant J.* **11**, 353-361.
- Teng S.C., Kim B. and Gabriel A. (1996) Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks. *Nature* **383**, 641-644.
- Tinland B. (1996) The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* **1**, 178-184.
- Tinland B., Hohn B. and Puchta H. (1994) *Agrobacterium tumefaciens* transfers single stranded T-DNA into the plant cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8000-8004.
- Tovar J. and Lichtenstein C. (1992) Somatic and meiotic chromosomal recombination between inverted duplications in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4**, 319-332.
- Thomas K.R. and Capecchi M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-512.
- Thykjaer T., Finnemann J., Schauser L., Christensen L., Poulsen C. and Stougaard J. (1997) Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking regions. *Plant. Mol. Biol.* **35**, 523-530.
- Vergunst A.C. and Hooykaas P.J.J. (1998) *Cre/lox*-mediated site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of *cre*. *Plant Mol. Biol.* **38**, 393-406.
- Vergunst A.C. and Hooykaas P.J.J. (1999) Recombination in the plant genome and its application in biotechnology. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 1-31.
- Vergunst A.C., Jansen L.E.T. and Hooykaas P.J.J. (1998) Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase. *Nucl. Acids. Res.* **26**, 2729-2734.
- Walbot V. (1985) On the life strategies of plants and animals. *Trends Genet.*, **1**, 165-169.
- West S.C. (1997) Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genet.* **31**, 213-244.
- Wessler S., Tarpley A., Purugganan M., Spell M. and Okagaki R. (1990) Filler DNA is associated with spontaneous deletions in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8731-8735.
- Wirz U., Schell J. and Czernilofsky A.P. (1987) Recombination of selectable marker DNA in *Nicotiana tabacum*. *DNA* **6**, 245-253.
- Ye S., Cole-Strauss A.C., Frank B. and Kmiec E.B. (1998) Targeted gene correction: a new strategy for molecular medicine *Mol. Med. Today* **4**, 431-437.
- Yoon K., Cole-Strauss A. and Kmiec E.B. (1996) Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2071-2076.
- Yusibov V.M., Steck T.R., Gupta V. and Gelvin S. (1994) Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2994-2998.
- Zhu T., Peterson D.J., Tagliani L., St. Clair G., Baszczyński C. and Bowen B. (1999) Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8768-8773.

Zickler D. and Kleckner N. (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 619-697.

7. Der Habilitation zugrunde liegende Veröffentlichungen

7.1. Übersichtsartikel

- [1] **Puchta H.**, Swoboda P. and Hohn B. (1994) Homologous recombination in plants. *Experientia* **50**, 277-284.
- [2] **Puchta H.** and Meyer P. (1994) Substrate specificity of plant recombinases determined in extrachromosomal recombination systems. In "Homologous recombination and gene silencing in plants", J. Paszkowski Edt., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 123-155.
- [3] **Puchta H.** and Hohn B. (1996) From centiMorgans to basepairs: Homologous recombination in plants. *Trends in Plant Sci.* **1**, 340-348.
- [4] **Puchta H.** (1998) Towards targeted transformation in plants. *Trends in Plant Sci.* **3**, 77-78.
- [5] **Puchta H.** (1999) Doppelstrangbruchreparatur und Genomevolution bei Pflanzen. *Biospektrum* **5**, 105-108.
- [6] **Puchta H.** (1999) Use of I-SceI to induce double-strand breaks in *Nicotiana*. In "DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems", Methods in Molecular Biology, D.S. Henderson Edt., Humana Press, New Jersey, 447-451.
- [7] Hohn B. and **Puchta H.** (1999) Gene therapy in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8321-8323.

7.2. Wissenschaftliche Publikationen in referierten Zeitschriften

7.2.1. Extrachromosomale Rekombination

- [8] **Puchta H.** and Hohn B. (1991) A transient assay in plant cells reveals a positive correlation between extrachromosomal recombination rates and length of homologous overlap. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2693-2700.
- [9] **Puchta H.** and Hohn B. (1991) The mechanism of extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 1-7.
- [10] **Puchta H.**, Kocher S. and Hohn B. (1992) Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells is fast and is not affected by CpG methylation. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3372-3379.
- [11] Tinland B., Hohn B. and **Puchta H.** (1994) *Agrobacterium tumefaciens* transfers single stranded T-DNA into the plant cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8000-8004.

7.2.2. Intrachromosomale Rekombination

- [12] Swoboda P., Gal S., Hohn B. and **Puchta H.** (1994) Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *EMBO J.* **13**, 484-489.
- [13] **Puchta H.**, Swoboda P. and Hohn B. (1995) Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *Plant J.* **7**, 203-210.
- [14] **Puchta H.**, Swoboda P., Gal S., Blot M. and Hohn B. (1995) Somatic intrachromosomal homologous recombination events in populations of plant siblings. *Plant Mol. Biol.*, **28**, 281-292.

7.2.3. Doppelstrangbruchreparatur

- [15] **Puchta H.**, Dujon B. and Hohn B. (1993) Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5034-5040.
- [16] **Puchta H.**, Dujon B. and Hohn B. (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5055-5060.
- [17] **Puchta H.** (1998) Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. *Plant J.* **13**, 331-339.
- [18] Salomon S. and **Puchta H.** (1998) Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J.* **17**, 6086-6095.
- [19] **Puchta H.** (1999) Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics* **152**, 1173-1181.

Aus Gründen der Urheberrechts können die Publikationen hier nur zitiert werden.

Erklärung über den persönlichen Anteil an den wissenschaftlichen

Publikationen [8] - [19]

- [8], [9]:** Die Veröffentlichungen resultieren aus Experimenten, die ausschließlich von mir als Postdoktorand im Labor von Prof. B. Hohn, die beratend zur Seite stand, durchgeführt wurden.
- [10] :** Die Veröffentlichung resultiert aus Experimenten, die teils von mir und teils von dem von mir betreuten Diplomanden Serge Kocher im Labor von Prof. B. Hohn, die beratend zur Seite stand, durchgeführt wurden.
- [11]:** Die Veröffentlichung resultiert von Experimenten, die ursprünglich von mir konzipiert und von mir und zum größeren Teil von dem Postdoktoranden Dr. Bruno Tinland im Labor von Prof. B. Hohn, die wiederum beratend zur Seite stand, durchgeführt wurden.
- [12]:** Die Veröffentlichungen resultiert aus Experimenten, die von mir und zum größeren Teil von dem von mir betreuten Doktoranden Peter Swoboda im Labor von Prof. B. Hohn, die beratend zur Seite stand, durchgeführt wurden. Frau Dr. Susannah Gal war als Postdoktorandin an der ursprünglichen Konzeption der Experimente beteiligt.
- [13]:** Die Veröffentlichungen resultiert aus Experimenten, die zum größeren Teil von mir und von dem von mir betreuten Doktoranden Peter Swoboda im Labor von Prof. B. Hohn, die beratend zur Seite stand, durchgeführt wurden.
- [14]:** Die Veröffentlichungen resultiert aus Experimenten, die zum größeren Teil von mir und von dem von mir betreuten Doktoranden Peter Swoboda im Labor von Prof. B. Hohn, die beratend zur Seite stand, durchgeführt wurden. Frau Dr. Susannah Gal war als Postdoktorandin an der ursprünglichen Konzeption der Experimente beteiligt, der Postdoktorand Dr. Michel Blot an der statistischen Auswertung.

[15], [16]: Die Veröffentlichungen resultieren aus Experimenten, die ausschließlich von mir als Postdoktorand im Labor von Prof. B. Hohn, die beratend zur Seite stand, durchgeführt wurden. Prof. B. Dujon stellte uns die Sequenz des unveröffentlichten, künstlichen I-SceI Gens zur Verfügung.

[17], [19]: Die Veröffentlichungen resultieren aus Ergebnissen, die von mir mit Hilfe der technischen Assistentinnen Petra Oswald und Christa Fricke in meiner Arbeitsgruppe durchgeführt wurden.

[18]: Die Veröffentlichung resultiert aus von mir konzipierten Experimenten, die der Doktorand Siegfried Salomon in meiner Arbeitsgruppe unter meiner Betreuung durchgeführt hat.

Lebenslauf

Dr. rer. nat. Holger Puchta

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)

D-06466 Gatersleben

Tel. 03942/5181

Fax. 03942/5137

email: puchta@ipk-gatersleben.de

Geboren am 14. August 1960 in Ingolstadt/Donau

Verheiratet, 2 Kinder

- 1966 - 1970 Besuch der Volksschule Ringsee in Ingolstadt
- 1970 - 1979 Besuch des Christoph-Scheiner-Gymnasiums in Ingolstadt
- 1979 - 1980 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians Universität München
- 1980 - 1985 Studium der Biochemie an der Eberhart-Karls Universität Tübingen
- 1983 - 1984 Einjähriger Studienaufenthalt am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
- 1985 - 1986 Anfertigung der Diplomarbeit "Klonierung und Analyse des Wirtsbereichs des Cucumber Pale Fruit Viroids (CPFV)" am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.L. Sänger
- 1986 - 1989 Anfertigung der Promotion "Untersuchung zur molekularen Struktur, zur Biologie und zur Verbreitung latenter Viroide in vegetativ vermehrten Kulturpflanzen" am gleichen Institut
- 1989 - 1995 Research Fellow am Friedrich Miescher-Institut, Basel, Schweiz in der Arbeitsgruppe von Frau PD. Dr. Barbara Hohn, Arbeitsgebiet: homologe DNA Rekombination in Pflanzen
- 1995 - 1997 DFG-Habilitationsstipendiat mit eigener Gruppe am IPK Gatersleben
Thema: Homologe und Illegitime DNA Rekombination
- ab 1997 Leiter der Arbeitsgruppe „DNA Rekombination“ am IPK Gatersleben

Halle, den 28. Juli 1999

Danksagung

Die vorgelegten Arbeiten wurden innerhalb eines Jahrzehnts am Friedrich-Miescher Institut in Basel und am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Prof. Barbara Hohn, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Ich verdanke ihr nicht nur das in dieser Arbeit vorgestellte Thema sondern auch meine „Erziehung“ zu einem kritischen Wissenschaftler. In Gatersleben bin ich Herrn Prof. Ulrich Wobus, dem Direktor des IPK, und besonders Herrn Dr. habil. Ingo Schubert, dem Leiter der Abteilung Cytogenetik, zu großem Dank verpflichtet. Sie haben mir nicht nur die Bildung einer eigenen Arbeitsgruppe ermöglicht, sondern auch meine Forschung mit großer Anteilnahme begleitet. Die zwischen unser herrschende große Übereinstimmung in menschlichen und wissenschaftlichen Werten war und ist für mich die wichtigste Grundlage meiner Arbeit am IPK.

Viele Menschen haben zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen: In Basel Dr. Bruno Tinland, Dr. Peter Swoboda, Dr. Serge Kocher, Dr. Susannah Gal, Tru-Nghi Emersleben und Cynthia Ramos, in Gatersleben Siegfried Salomon, Petra Oswald und Christa Fricke. Nicht unerwähnt bleiben sollen die zahlreichen Kooperationspartner im In- und Ausland mit denen ich im Laufe der letzten 10 Jahre zusammengearbeitet habe, ebenso alle die Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe in Gatersleben, deren Arbeiten in dieser Schrift nicht (mehr) berücksichtigt werden konnten.

Weiterhin möchte ich den Institutionen danken, die mir Mittel für meine Forschung zur Verfügung gestellt haben, nämlich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Kultusministerium des Landes Sachsen-Anhalt, der Europäischen Union und dem Schweizer Nationalfonds.

Frau Prof. Ulla Bonas, Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für Ihre bereitwillige Unterstützung des Habilitationsverfahrens.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Dr. Waltraud Schmidt-Puchta.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an des Eides statt, daß ich die Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benützt habe. Die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 28. Juli 1999

Holger Puchta