



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Improving targeted gene editing in *Arabidopsis thaliana*

Kamoen, L.

### Citation

Kamoen, L. (2025, June 10). *Improving targeted gene editing in Arabidopsis thaliana*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4249642>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4249642>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).



## Samenvatting

In de plantenbiotechnologie is het essentieel om de mechanismen van DNA-reparatie en genetische modificatie te begrijpen voor gewasverbetering. Dubbelstrengsbreuken (DSB's) in DNA zijn kritieke beschadigingen die via verschillende routes kunnen worden gerepareerd, zoals homologe recombinatie (HR), klassieke niet-homologe end-joining (cNHEJ) en polymerase theta-gemedieerde end-joining (TMEJ). cNHEJ is een snel reparatieproces dat de gebroken DNA-uiteinden direct aan elkaar vastmaakt, meestal foutloos, hoewel soms kleine inserties of deleties kunnen optreden. TMEJ daarentegen gebruikt microhomologe sequenties om de DNA-uiteinden uit te lijnen voordat ze aan elkaar worden verbonden, wat kan leiden tot grotere deleties of complexe herschikkingen.

CRISPR/Cas-technologie heeft de plantenbiotechnologie gerevolutioneerd door een nauwkeurige methode te bieden voor het induceren van DSB's op specifieke genomische locaties. Er bestaan meerdere systemen met verschillende Cas-enzymen, zoals Cas9 en Cas12a, elk met hun eigen specificiteiten. De door deze enzymen gecreëerde breuken kunnen vervolgens door de endogene mechanismen van de plant worden hersteld, wat leidt tot gerichte mutaties of geninserties op een vooraf bepaalde plek.

*Agrobacterium tumefaciens*, een bacterie die van nature DNA overdraagt aan plantencellen, wordt veel gebruikt in de plantenbiotechnologie voor genetische transformatie. De bacterie bevat een plasmide met een regio die bekend staat als transfer-DNA (T-DNA). Dit T-DNA kan worden getransporteerd naar plantencellen, waar het integreert in het plantengenoom op een DSB-locatie, gefaciliteerd door de eigen reparatiemachinerie van de plant. T-DNA integreert vaak op willekeurige posities in het genoom, waarbij complexe multimere configuraties en translocaties kunnen ontstaan. Gerichte T-DNA-integratie op een vooraf gedefinieerd locus zou deze positionele variaties wegnemen, wat aanzienlijke voordelen biedt voor gewasverbetering. Eerdere studies hebben aangetoond dat DSB-inductie gerichte T-DNA-integratie kan bewerkstelligen. De introductie van het zeer efficiënte CRISPR/Cas9-systeem naast T-DNA-transformatie vertegenwoordigt daarom een veelbelovende stap voorwaarts voor nauwkeurige integratie van exogeen DNA.

In dit proefschrift onderzoeken we de mechanismen van CRISPR/Cas-geïnduceerde DSB-reparatie in de modelplant *Arabidopsis thaliana* (zandraket) en hoe deze reparatieprocessen zich verhouden tot T-DNA-integratie op de breukplaatsen. Daarnaast streven we ernaar om nieuwe methoden voor gerichte modificatie te ontwikkelen door deze mechanismen in detail te onderzoeken. De combinatie van *Agrobacterium*-gemedieerde transformatie en CRISPR/Cas-technologie biedt talloze mogelijkheden voor precieze genetische modificaties, maar is nog steeds slecht gekarakteriseerd. Deze studie probeert die leemte op te vullen door een uitgebreide analyse van deze processen te bieden.

**Hoofdstuk 2** onderzoekt de complexe mechanismen van DNA-reparatie en het vastmaken van T-DNA bij CRISPR/Cas9-geïnduceerde DSB's. We ontdekten dat twee primaire routes, cNHEJ en TMEJ, verantwoordelijk zijn voor het repareren van deze breuken, die elk leiden tot verschillende mutatie-uitkomsten. Met behulp van geavanceerde sequentietechnieken ontdekten we dat T-DNA-integratie op DSB-locaties een veelvoorkomend fenomeen is. TMEJ speelt een cruciale rol bij het bevestigen van het 3'-uiteinde van T-DNA aan de breuk, terwijl zowel TMEJ als cNHEJ het 5'-uiteinde kunnen bevestigen. Deze dubbele betrokkenheid benadrukt de complexiteit en redundantie van de DNA-reparatiemechanismen van de plant. Ook werden fragmenten van het T-DNA vaak gevonden binnen genomische DSB-reparatielocaties, wat duidt op frequente tijdelijke interacties tijdens TMEJ. De bevindingen suggereren dat CRISPR-geïnduceerde DSB's kunnen dienen als efficiënte plaatsen voor het vastmaken van T-DNA, wat belangrijke implicaties heeft voor genoombewerking.

Terwijl Hoofdstuk 2 zich richt op Cas9, biedt **Hoofdstuk 3** een gedetailleerde vergelijking van de mutageneseprofielen die worden geïnduceerd door twee CRISPR-nucleasen, Cas9 en Cas12a. Beide nucleasen blijken DSB's te induceren die voornamelijk worden gerepareerd door cNHEJ en TMEJ, waarbij cNHEJ verantwoordelijk is voor 70% van de mutaties en TMEJ voor 30%. De studie onthult dat de configuratie van DSB-uiteinden (stomp voor Cas9 en 5'-overhangend voor Cas12a) de keuze van de reparatieroute niet significant beïnvloedt. Het belangrijkste verschil tussen de nucleasen is het frequente voorkomen van inserties van 1 bp, waarvan is aangetoond dat ze het resultaat zijn van polymerase lambda ( $Pol\lambda$ )-actie op Cas9-geïnduceerde DSB's. Interessant genoeg faciliteren beide nucleasen de integratie van T-DNA in DSB's. Long-read-sequencing benadrukte een hogere mate van DNA-verlies tijdens TMEJ-reparatie. De bevindingen suggereren dat zowel Cas9 als Cas12a even effectief zijn voor genoombewerking, en flexibiliteit bieden in nucleasekeuze op basis van de beschikbaarheid van compatibele PAM-sequenties. Dit onderzoek vergroot ons begrip van CRISPR-gebaseerde genoombewerking in planten en ondersteunt de ontwikkeling van nauwkeurigere genetische modificatiestrategieën voor gewasverbetering.

CRISPR-gebaseerde mutagenese leidt vaak tot een divers scala aan mutatie-uitkomsten. Om de mogelijkheid voor meer voorspelbare mutagenese te onderzoeken, richt **Hoofdstuk 4** zich op de reparatie van DSB's geflankeerd door korte homologe sequenties. Dit proces, extended microhomology-mediated end joining (eMMEJ) genoemd, begunstigt één specifieke uitkomst: de precieze verbinding van de homologe flanken, wat resulteert in de verwijdering van een van de homologe regio's en de sequentie ertussen. We ontdekten dat eMMEJ, veel voorkomend in wilde-type planten, afwezig was in polymerase theta ( $Pol\theta$ )-deficiënte planten. Om te bestuderen hoe  $Pol\theta$  betrokken is bij eMMEJ, hebben we het *TEB*-gen, dat codeert voor  $Pol\theta$ , opnieuw geïntroduceerd in de *teb*-mutant via *Agrobacterium*-gedieerde transformatie, waardoor de eMMEJ-activiteit volledig werd hersteld. Met behulp van dit systeem hebben we de twee cruciale domeinen van  $Pol\theta$  onderzocht: het N-terminale helicase-domein en het C-terminale polymerase-domein. Terwijl polymerase-activiteit vereist is in de meeste sequentie-

contexten, zijn DSB's die eMH bevatten uitsluitend afhankelijk van de helicase-activiteit van Pol $\theta$ , waardoor het polymerase-domein overbodig wordt. Deze kennis biedt nieuwe mogelijkheden om gerichte mutagenese te sturen naar één voorspelbare uitkomst.

Na een gedetailleerde analyse van CRISPR-gemedieerde DSB-reparatie en gerichte T-DNA-integratie, streeft **Hoofdstuk 5** ernaar dit mechanisme grondig te begrijpen, rekening houdend met alle mogelijke uitkomsten, inclusief zowel de gewenste effecten als eventuele onbedoelde consequenties. We karakteriseerden CRISPR-geïnduceerde DSB's op meerdere genomische locaties en in het T-DNA zelf, en ontdekten dat de reparatieprocessen op het T-DNA opmerkelijk vergelijkbaar zijn met die in het genoom, met consistente reparatievoetafdrukken. Dit vergemakkelijkt de studie van elk gewenst DSB-doelwit naar believen, wat mogelijk zelfs de weg vrijmaakt voor multiplexstrategieën. Bovendien toont ons onderzoek aan dat geknipt T-DNA efficiënt in het genoom kan worden opgenomen, met een knipefficiëntie van bijna 100%. Dit maakt de integratie van T-DNA mogelijk zonder ongewenste sequenties, zoals de linker border of de selectiemarker. Tot slot ontdekten we dat het gelijktijdig induceren van meerdere DSB's vaak resulteert in de fusie van breekuiteinden, wat leidt tot genomische afwijkingen. Hoewel deze flexibiliteit voordelig kan zijn voor gerichte genoom-modificatie, is het cruciaal om te letten op mogelijke bijwerkingen.

Ten slotte combineert **Hoofdstuk 6** de inzichten uit de voorgaande hoofdstukken om een nieuwe methode te ontwikkelen voor gerichte T-DNA-integratie en genmodificatie. Efficiënte technieken voor precieze en gerichte genmodificatie in plantengenomen hebben een groot potentieel om veredelingsinspanningen te versnellen. Gene targeting (GT) is een veelgebruikte methode die gewenste genetische modificaties bereikt door een donor-DNA-molecuul te introduceren om een gerichte DNA verandering te verkrijgen. Deze methode is echter afhankelijk van HR, waardoor succesvolle GT-gebeurtenissen zeldzaam zijn. Om deze uitdaging te overwinnen, hebben we een alternatieve methode ontwikkeld op basis van het efficiëntere eMMEJ-proces. Door op het T-DNA een eMH-sequentie toe te voegen die overeenkomt met het genomische doellocus, bereikten we hoge percentages van gerichte eMMEJ-gemedieerde T-DNA inbouw. Net als bij DSB-reparatie was eMMEJ de meest voorkomende gebeurtenis, die de gerichte inbouw met willekeurige homologie aanzienlijk overtrof. Bovendien zagen we een algehele toename in gerichte inbouw wanneer eMH aanwezig was, in tegenstelling tot de afwezigheid van homologie. Voortbouwend op deze resultaten ontwikkelden we een techniek voor subtielere bewerkingen dan volledige T-DNA-integratie. Door een dubbele T-DNA-benadering te gebruiken, waarbij de gewenste genetische veranderingen in één T-DNA werden opgenomen, terwijl een ander T-DNA de benodigde reagentia bevatte, waaronder Cas9, sgRNA en een selectiemarker, verkregen we met succes gerichte mutaties, variërend van enkelvoudige nucleotidopolymorfismen (SNP's) tot grotere inserties en vervangingen. Deze methode bereikte een bewerkingsefficiëntie van ongeveer 2%, veel hoger dan de typische GT-efficiëntie.

Deze uitgebreide verkenning van DNA-herstelmechanismen, CRISPR/Cas-technologie en gerichte genmodificatie in de plantenbiotechnologie benadrukt het enorme potentieel voor het bevorderen van gewasverbetering en duurzame landbouw.

