

Der RTR-Komplex in *Arabidopsis thaliana* – molekulare Charakterisierung von DNA- Reparaturmutanten

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Stefanie Suer

aus Ibbenbüren

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse
Referent: Prof. Dr. Holger Puchta
Korreferent: Priv. Doz. Dr. Natalia Requena
Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2008

DANKSAGUNG

Für die Möglichkeit der Promotion und das ausgesprochen interessante und anspruchsvolle Thema möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Holger Puchta bedanken. Sehr motivierend waren die intensive strategische Beratschlagung bezüglich des experimentellen Vorgehens und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Dabei bin ich dankbar für die Erfahrungen, die ich bei der Betreuung von Diplomanden und Praktikanten sammeln durfte, sowie für die Möglichkeit, mich auf Tagungen durch die Präsentation eigener Ergebnisse im fachlichen Austausch üben zu dürfen und dabei „über den Tellerrand hinausschauen“ zu können.

Bei Priv. Doz. Dr. Natalia Requena möchte ich mich für die Übernahme der Aufgabe des Korreferenten bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Priv. Doz. Dr. Frank Hartung für die intensive Betreuung der von mir bearbeiteten Projekte, für die unzähligen Vorarbeiten und den riesigen Erfahrungsschatz von dem ich profitiert habe. Durch die Bearbeitung engverwandter Fragestellungen konnte stets eine strategische Richtung befahren und weiter entwickelt werden, aus der schließlich einige bemerkenswerte Ergebnisse hervorgingen. Dabei bin ich ebenso dafür dankbar, dass ich im Rahmen dieser überaus guten Zusammenarbeit an mehreren qualitativ hochwertigen Publikationen beteiligt sein durfte.

Den Mitarbeitern des botanischen Gartens, insbesondere Herrn Karlheinz Knoch, Frau Waldtraut „Traudel“ Wehrle und Herrn Kevin Malakowsky danke ich herzlich für die Pflege meiner in Erde angezogenen Pflanzen, die mit viel Erfahrung, Sorgfalt und Hilfsbereitschaft bedeutend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Durch ihre freundlichen Art und das ungezwungene Arbeitsklima waren mir die täglichen Gänge in den Garten eine echte Freude.

Für die exzellente technische Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre im Labor möchte ich mich insbesondere bei Renate Kirchenbauer bedanken, die mir nicht nur bei unzähligen PCR-Screenings eine große Hilfe war. Auch allen anderen technischen Kräften des Instituts Botanik II möchte ich für ihre Unterstützung und Freundlichkeit danken, darunter besonders Frau Sabine Zeiler.

Dr. Manfred Focke danke ich für das Korrekturlesen dieses Manuskripts, sowie für seine große Hilfsbereitschaft und organisatorisches Talent, mit dem er unzählige Male zur Lösung kleinerer Probleme sowohl wissenschaftlicher als auch praktischer Art beitrug.

Für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre danke ich den aktuellen Doktoranden des Botanik II – Instituts, sowie denen die ihre Arbeit bereit abgeschlossen haben, und dabei nicht zuletzt für die vielen

offenen Ohren und Türen, die dieses Institut zu einem besonderen Arbeitsplatz machen. Darunter möchte ich mich vor allem bei Alexander Knoll für die Vorarbeiten zu den in dieser Arbeit durchgeführten Komplementationen sowie unzählige fachliche Diskussionen, Ideen und Ratschläge bedanken. Rebecca Wurz-Wildersinn verdanke ich die methodischen Grundlagen der meiotischen Untersuchungen, die sie mit viel Sorgfalt und Einsatz etablierte, an mich weitergab, und dabei immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Verena Geuting danke ich nicht nur für die Beratschlagung in wissenschaftlichen Fragestellungen, sondern insgesamt für eine schöne gemeinsame Zeit während der Doktorarbeit.

Weiterhin danke ich Andreas Braun und Antje Stotz für ihre Beiträge aus Staatsexamens- und Diplomarbeit.

Für die Motivation und Unterstützung möchte ich mich herzlich bei meinen Freunden bedanken, die mich während meiner gesamten Doktorarbeit und bereits davor begleitet haben. Darunter sind an dieser Stelle besonders Juliane Dettling, Birgit Baron, Marion Pfefferle, Silke Pichlau, Larissa Pietsch, und Nora Seiterle hervorzuheben.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern, danke ich für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG.....	I
INHALTSVERZEICHNIS.....	III
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGEN	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Bedeutung der RecQ-Helikasen.....	3
1.1.1 Die RecQ-Helikasen – Entdeckung und Definition	3
1.1.2 Eukaryotische Homologe und ihre Mutanten.....	4
1.1.3 Biochemische Eigenschaften.....	8
1.2 Der RTR-Komplex im Kontext der DNA-Reparatur.....	11
1.2.1 Wege der DNA-Reparatur.....	11
1.2.2 Der Doppelstrangbruch als Ausgangspunkt für HR.....	15
1.2.3 Reparatur der DSBs durch somatische oder meiotische HR	17
1.2.4 Bisher bekannte Komponenten des RTR-Komplexes	21
1.2.5 Beteiligung des RTR-Komplexes an den verschiedenen DSB-Reparaturwegen	22
1.2.6 Potenzielle Komponenten des RTR-Komplexes in <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
1.3 Ziel dieser Arbeit	27
2 MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1 Sterile Pflanzenkultur	28
2.1.1 Sterilisieren von Arabidopsis-Saatgut	28
2.1.2 Sterile Anzucht von Arabidopsis-Keimlingen	28
2.1.3 Mutagen-Behandlung	29
2.1.4 Rekombinationsassay	30
2.2 Anzucht und Versuche im Gewächshaus	32
2.2.1 Anzuchtbedingungen.....	32
2.2.2 Kreuzungen	32
2.2.3 Transformation mit Hilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33

2.2.4	Schotenuntersuchungen.....	34
2.3	Blütenuntersuchungen	34
2.3.1	Alexanderfärbung von Pollen.....	34
2.3.2	Fluorescein-Diacetat-Färbung von Blütenpollen	35
2.3.3	DAPI-Färbung von Meiose- und Mitosestadien in der Pollenentwicklung	35
2.3.4	DIC-Mikroskopie zur Untersuchung des weiblichen Gametophyten	36
2.4	Nukleinsäure-Präparationen	37
2.4.1	Kleine „Shorty“- DNA-Präparation für Genotypisierung	37
2.4.2	RNA-Isolierung.....	38
2.4.3	Umschreiben von RNA in cDNA für Expressionsanalysen.....	38
2.5	PCR-Methoden	38
2.5.1	Mutanten-Genotypisierung.....	39
2.5.2	Insertionsorts-Charakterisierung	41
2.5.3	Expressionsanalyse.....	41
2.6	Organismen	42
2.6.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
2.6.2	<i>Arabidopsis</i> -Linien	42
3	ERGEBNISSE.....	44
3.1	RECQ4A und 4B als potenzielle RTR-Komponenten.....	44
3.1.1	Sensitivitäten der Mutanten gegenüber genotoxischem Stress	44
3.1.2	Homologe Rekombination in den Mutanten von <i>RECQ4A</i> und <i>4B</i>	46
3.2	MUS81 als potenzieller Kandidat eines alternativen HR-Weges	48
3.2.1	Sensitivität der <i>MUS81</i> -Mutanten gegenüber genotoxischem Stress.....	48
3.2.2	Homologe Rekombination in den <i>MUS81</i> -Mutanten.....	49
3.2.3	Zusammenhang zwischen <i>recq4A</i> und <i>mus81</i>	51
3.3	<i>RMII</i> – Ein Gen, zwei Phänotypen	53
3.3.1	Bestimmung der T-DNA-Insertionsorte in <i>rmi1-1</i> und <i>rmi1-2</i>	53
3.3.2	Expression von <i>RMII</i> in den Mutantenlinien <i>rmi1-1</i> und <i>rmi1-2</i>	55
3.3.3	In <i>rmi1-1</i> und <i>rmi1-2</i> ist die Fertilität unterschiedlich stark eingeschränkt	56

3.4	Meiotische Untersuchungen der <i>rmi1</i>- und <i>top3α</i>-Mutantenlinien	58
3.4.1	Entwicklung des weiblichen Gametophyten in <i>rmi1-1</i>	58
3.4.2	Meiotischer Defekt von <i>rmi1-1</i> verglichen mit <i>top3α-2</i>	60
3.5	<i>RMI1</i> und <i>TOP3α</i> in der somatischen HR und DNA-Reparatur	63
3.5.1	Sensitivitäten der Mutanten gegenüber genotoxischen Agenzien	63
3.5.2	Die Rolle von <i>RMI1</i> und <i>TOP3α</i> in der somatischen HR	66
3.5.3	Komplementation der Mutantenphänotypen von <i>rmi1</i> und <i>top3α</i>	67
4	DISKUSSION	70
4.1	Zwei ungleiche Partner eines duplizierten Genpaares	70
4.2	RECQ4A und MUS81 in somatischen Zellen von <i>Arabidopsis</i>	73
4.3	Ein konservierter RTR-Komplex in <i>A. thaliana</i>	75
4.4	Meiotische Funktionen der potenziellen RTR-Gene in <i>A. thaliana</i>	79
5	AUSBLICK	84
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	SUMMARY	87
8	LITERATUR	88
	ANHANG	99
	LEBENS LAUF	101
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	102

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Eingesetzte Antibiotika für die Selektion transgener Pflanzen	29
Tabelle 2: Konzentrationen der in Sensitivitätstests eingesetzten Mutagene	30
Tabelle 3: Mutagenbehandlung steriler Mutanten und entsprechender Kontrollen	30
Tabelle 4: Für die Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien verwendete Oligonukleotide	40
Tabelle 5: Oligonukleotide für die Analyse der <i>RMI1</i> -Expression in <i>rmi1-1</i> und <i>rmi1-2</i>	42
Tabelle 6: T-DNA-Insertionslinien von <i>A. thaliana</i>	43
Tabelle 7: Daten zur HR in den <i>recq4A</i> - und <i>4B</i> -Linien (IC9C).....	47
Tabelle 8: Daten zur HR in den <i>MUS81</i> -Mutanten (651)	49
Tabelle 9: Daten zur HR in den <i>MUS81</i> -Mutanten (IC9C).....	50
Tabelle 10: Daten zur HR in <i>top3α-2</i> , <i>rmi1-1</i> und <i>recq4A-1</i> (IC9C).....	67

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Zeichnung des RECQ-Proteins von <i>E. coli</i>	4
Abbildung 2: Mit RecQ-Mutationen des Menschen assoziierte Krankheitsbilder	5
Abbildung 3: RecQ-Proteine von <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> und <i>H. sapiens</i>	6
Abbildung 4: RecQ-Proteine in <i>A. thaliana</i>	8
Abbildung 5: Substrate der RecQ-Helikasen	10
Abbildung 6: Typische Schäden, wie sie an Replikationsgabeln auftreten.....	12
Abbildung 7: „Chickenfoot“-Struktur	13
Abbildung 8: Initiation der HR ausgehend von einem DSB	18
Abbildung 9: Zwei parallele Wege der Auflösung doppelter Holliday-Strukturen	19
Abbildung 10: IC9C-Pflanzen nach dem Entfärben in 70 % vergälltem Ethanol	31
Abbildung 11: Auswahl geeigneter Blüten für die DAPI-Färbung	36
Abbildung 12: MMS-behandelte Mutanten von <i>RECQ4A</i> und <i>4B</i>	45
Abbildung 13: Cis-Platin-behandelte Mutanten von <i>RECQ4A</i> und <i>4B</i>	45
Abbildung 14: <i>Recq4A</i> - und <i>4B</i> -Pflanzen nach cis-Platin-Behandlung	46
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Assaykonstrukte 651 und IC9C	46
Abbildung 16: Interchromosomale HR in den Mutanten von <i>RECQ4A</i> und <i>4B</i>	47
Abbildung 17: Cis-Platin-behandelte Pflanzen von <i>mus81-1</i> und -2	48
Abbildung 18: Intra- und interchromosomale HR in den Mutanten von <i>MUS81</i>	49

Abbildung 19: Interchromosomale HR in den Mutanten von <i>MUS81</i>	50
Abbildung 20: Letalität der Doppel-mutante von <i>mus81</i> und <i>recq4A</i>	52
Abbildung 21: Aufhebung der Letalität von <i>mus81-1/recq4A-1</i> durch <i>rad51C</i>	52
Abbildung 22: Meiotische Defekte in der Dreifachmutante <i>mus81-1/recq4A-1/rad51C</i>	53
Abbildung 23: T-DNA-Insertionsorte in <i>rmi1-1</i> und <i>rmi1-2</i>	54
Abbildung 24: RT-PCR zur Bestimmung der <i>RMI1</i> -Expression in den Mutanten	55
Abbildung 25: Alexanderfärbung von Antheren der <i>RMI1</i> -Mutanten	56
Abbildung 26: Fluorescein-Diacetat-Färbung von <i>rmi1</i> -Pollen.....	57
Abbildung 27: Degenerierte Samenanlagen in Schoten von <i>rmi1-2</i>	57
Abbildung 28: Entwicklung des weiblichen Gametophyten in <i>rmi1-1</i>	59
Abbildung 29: Meiose in <i>rmi1-1</i> im Vergleich zu Col-0, <i>recq4A-1</i> und <i>top3α-2</i>	61
Abbildung 30: Anaphase I in <i>rmi1-1</i> und den Doppelmutanten von <i>top3α</i> und <i>recq4A</i>	62
Abbildung 31: MMS-Behandlung von <i>top3α-2</i> und <i>rmi1-2</i> im Vergleich mit <i>recq4A-1</i>	64
Abbildung 32: Cis-Platin-Behandlung von <i>top3α-2</i> und <i>rmi1-2</i>	65
Abbildung 33: Camptothecin-Behandlung von <i>top3α-2</i> und <i>rmi1-2</i>	65
Abbildung 34: HR in <i>rmi1-1</i> und <i>top3α-2</i> im Vergleich mit <i>recq4A-1</i>	66
Abbildung 35: Schoten der komplementierten <i>top3α</i> -Pflanzen.....	68
Abbildung 36: Statistische Untersuchung der Schoten nach <i>top3α</i> -Komplementation	69
Abbildung 37: RECQ4A, TOP3 α , RMI1 und MUS81 an angehaltenen Replikationsgabeln.....	78
Abbildung 38: Zusammenfassung der Funktionen der untersuchten Gene.....	80

ABKÜRZUNGEN

<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
aa	Amino acid (Aminosäure)
ATP	Adenosintriphosphat
BLAP75	Bloom associated protein 75
BLE	Bleomycin
BLM	Bloom's Syndrome RecQ Helicase
bp	Basenpaar
BTB	BLM-TOP3 α -BLAP75
cis-Platin	cis-Diamin-dichloro-platin (II)
CO	Crossover
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ökotyp Columbia
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dHJ	doppelte Holliday-Junction
DIC	differential interference contrast
D-Loop	displacement loop
DMC1	disrupted meiotic cDNA 1
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EME1	essential meiotic endonuclease 1
F1	Filialgeneration 1
GM	germination medium
GUS	β -Glucuronidase
HJ	Holliday-Junction
HR	Homologe Rekombination
HRDC	Helicase and RNase D C-terminal
Hs	<i>Homo sapiens</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KU70, 80	Kunitz Autoantigen 70, 80
LB	left border
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat

MMS4	methyl methane sulfonate sensitivity 4
MRE11	meiotic recombination 11
MRN	Komplex aus MRE11, RAD50 und NBS1
MRX	Komplex aus MRE11, RAD50 und XRS2
MSH4, 5	Mut S homolog 4, 5
MUS81	MMS and UV sensitivity 81
NCO	non-crossover
NER	Nukleotid-Excisions-Reparatur
NHEJ	Nonhomologous Endjoining – Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung
NVS1	Nijmegen breakage syndrome 1
OB-Fold	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RAD	radiation sensitive
RB	right border
RMI1	RecQ mediated genome instability 1
RPA	replication protein A (SSB-Homolog der Eukaryoten)
RQC	RecQ C-terminale Domäne
RTR	RecQ-TOP3 α -RMI1
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCE	sister chromatide exchange (Austausch des Erbmaterials zwischen Schwesterchromatiden)
SDSA	Synthesis Dependent Strand Annealing
SGS1	slow growth suppressor 1
S-Phase	Synthese-Phase
SPO11	sporulation defective 11
SSB	single strand binding protein
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
T-DNA	Transfer-DNA
TLD	thymineless death (Zelltod bei Thymin-Mangel)
TOP1, 3	Topoisomerase 1, 3
WRN	Werner Syndrom RecQ-Helikase
X-GlcA	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronid, Cyclohexyl-Ammoniumsalz
XPF	Xeroderma pigmentosum F
XRCC	X-ray repair cross complementing
YEB	yeast extract broth

1 EINLEITUNG

Biologische Vielfalt erfordert Veränderung. So können Mutationen in Genen, ausgelöst durch ganz unterschiedliche Faktoren, zu veränderten Proteineigenschaften führen. Diese können eine Anpassung der entsprechenden Spezies an neue Lebensbedingungen ermöglichen, oder bei gleichen Umweltbedingungen erhöhte Fitness vermitteln. Während der Meiose werden Brüche in der Erbsubstanz sogar gezielt induziert, um im Zuge der Neukombination des elterlichen Erbguts durch Homologe Rekombination genetische Individualität und Vielfalt hervorzubringen.

Dem gegenüber steht die Gefahr der negativen Veränderung durch Schäden, da die korrekte Weitergabe der Erbinformation an die Tochterzellen eine essentielle Voraussetzung für die Stabilität von Arten darstellt. Das Erbgut aller Organismen ist permanent Schädigungen ausgesetzt, deren Herkunft sowohl exogener als auch endogener Natur sein kann. Zu den äußeren Einflüssen zählen Faktoren wie Strahlung und Chemikalien, während innerhalb der Zelle auch eigene Stoffwechselmetabolite, sowie Störungen während der Replikation zur Veränderung der Erbsubstanz führen können.

Eine optimale Balance zwischen diesen gegensätzlichen Facetten der genetischen Veränderung erfordert effiziente, auf die verschiedenen Schadenstypen abgestimmte DNA-Reparaturwege.

Arabidopsis thaliana stellt vor allem deshalb einen geeigneten Modellorganismus zum Studium der DNA-Reparatur dar, weil inzwischen zahlreiche Mutanten von Genen, die an Wegen der Replikation und Rekombination beteiligt sind, identifiziert wurden. So lässt sich das erlangte Wissen zusammentragen und diskutieren, sowie auf andere Pflanzen übertragen. Eine starke evolutionäre Konservierung vieler Gene und Stoffwechselwege ermöglicht zudem die Diskussion über die Grenzen der biologischen Reiche hinweg. So finden sich zahlreiche Homologe von DNA-Reparaturgenen schon in Bakterien und eukaryotischen Einzellern, wie man sie in oftmals größerer Anzahl und damit womöglich mit einem höheren Grad der Differenzierung in mehr- oder vielzelligen tierischen und pflanzlichen Organismen entdeckt hat. Die sogenannte Ackerschmalwand wurde im Jahre 1943 erstmals als Modellorganismus beschrieben (Laibach, 1943). Die einjährige Pflanze zeichnet sich bei Anzucht im Gewächshaus durch eine kurze Generationszeit von nur etwa acht Wochen, eine große Anzahl an Nachkommen und anspruchsloses Wachstum aus. Dadurch ist sie im Labor vergleichsweise preiswert und einfach zu kultivieren. Durch die Möglichkeit der Selbstbestäubung und die unkomplizierte Aufbewahrung des Saatguts über einige Jahre hinweg, lassen sich Linien langfristig erhalten und lagern. Zudem wurde gegen Ende des Jahres 2000 das Genom der Ackerschmalwand vollständig sequenziert. Mit etwa 135 Megabasenpaaren ist es verhältnismäßig klein und mit dem Genom anderer Modellorganismen wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* vergleichbar (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Adams *et al.*, 2000; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000 und 2007).

Der Fokus dieser Arbeit richtet sich auf die Familie der RecQ-Helikasen. Diese treten bei Mensch und Hefe gemeinsam mit einer Topoisomerase des Typs 1A (TOP3/TOPO3 α) und einem als DNA-Bindeprotein eingestuften Protein (RMI1/BLAP75) in einem als RTR für „RECQ-TOP3-RMI1“, oder alternativ als BTB für „BLM-TOP3 α -BLAP75“, bezeichneten Komplex auf (Mullen *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005). Die RecQ-Helikasen sind vor allem deshalb von allgemeinem Interesse, weil Mutationen in drei der fünf menschlichen Homologen mit schweren Erbkrankheiten in Verbindung stehen: Den sogenannten Bloom-, Werner- und Rothmund-Thomson-Syndromen. Neben den charakteristischen Merkmalen der einzelnen Syndrome zeichnen sich alle drei Krankheiten durch starke Dispositionen für verschiedene Krebsarten aus, die ganz allgemein auf genomische Instabilität infolge der RecQ-Mutationen zurückzuführen sind. (Ellis *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996; Kitao *et al.*, 1999).

Aufgrund der Phänotypen von Mutanten verschiedener Organismen, die sich vor allem durch Hyperrekombination und Sensitivitäten gegenüber DNA-schädigenden Agenzien auszeichnen, werden die RecQ-Helikasen als Erhalter der genomischen Stabilität angesehen. Modelle zur Beschreibung ihrer Funktionen wurden vor allem am Modellsystem Bäckerhefe entwickelt, an Mutanten der dort einzigen vorkommenden RecQ-Helikase SGS1. Funktionen, die von dieser Proteinfamilie dabei wahrgenommen werden, betreffen die Reparatur verschiedener Schadenstypen während der Replikation und Rekombination, sowie den Erhalt der Chromosomenstruktur im Bereich der Telomere (Übersicht in Bjergbaek *et al.*, 2002).

Der Aufklärung solch universeller RecQ-typischer Funktionen, die sich über die Grenzlinien der biologischen Reiche hinweg wiederfinden und verallgemeinern lassen, stellt sich die Frage gegenüber, wie sich im Laufe der Evolution in Mehr- und Vielzellern jeweils mehrere Homologe entwickelt und spezialisiert, bzw. redundante Funktionen bewahrt haben. Die Untersuchung dieser Diversifikation ist Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit. Dabei wurden zwei nahe verwandte RecQ-Homologe von *A. thaliana*, RECQ4A und 4B, vergleichend bezüglich möglicher Funktionen und Interaktionen charakterisiert.

1.1 Die Bedeutung der RecQ-Helikasen

1.1.1 Die RecQ-Helikasen – Entdeckung und Definition

RECQ wurde im Jahre 1984 erstmals anhand einer TLD-Mutante (thymineless death) von *Escherichia coli* als eine Komponente des RecF-Weges der Rekombination beschrieben. Im Gegensatz zu recF, dem Namensgeber dieses durch DNA-Schäden induzierbaren Reparaturweges, führte diese Mutation nicht allein, sondern erst im Hintergrund einer gleichzeitigen Mutation von Komponenten des parallel geschalteten RecABC-Weges zu der erwarteten Sensitivität gegenüber UV-Strahlung, sowie Defekten in der Rekombination (Nakayama *et al.*, 1984). Einige Jahre später wurde RECQ biochemisch charakterisiert und als DNA-Helikase eingeordnet, die unter ATP-Verbrauch DNA in 3'-5'-Richtung entwindet (Umezumi *et al.*, 1990). Das Protein hat eine Größe von 610 Aminosäuren und eine relative Molekülmasse von 68 kDa. Es prozessiert *in vitro* in Anwesenheit von Mg²⁺ als Cofaktor diverse DNA-Substrate wie die sogenannten 'Holliday Junctions' (HJs), G4-DNA, DNA mit 'Blunt Ends', und Enden, die entweder 3'- oder 5'-Überhänge aufweisen können.

Dem Protein RECQ wurden in *E. coli* verschiedene Funktionen bei Prozessen nachgesagt, in denen die oben aufgeführten Strukturen auftreten; darunter die Initiation der Rekombination, Auflösung von Rekombinationsintermediaten, Unterdrückung der illegitimen Rekombination und Induktion der SOS-Antwort an Replikationsgabeln, die wegen Brüchen angehalten wurden (Übersicht in Heyer, 2004).

Homologe des *E. coli*-Prototyps konnten inzwischen in allen daraufhin untersuchten Eu- und Prokaryoten gefunden werden, und die Anzahl an RecQ-Genen, die in einem Organismus kodiert wird, steigt tendenziell mit seiner Komplexität. So findet man in Einzellern wie der Bäckerhefe meist nur einzelne Homologe, während vielzellige Eukaryoten jeweils mehrere RecQ-Gene besitzen (Übersicht in Hartung und Puchta, 2006).

Drei konservierte Domänen, die diese Familie auszeichnen, sind die Helikase-, die RecQ-Ct- und die HRDC-Domäne, wie in Abbildung 1 dargestellt (Morozov *et al.*, 1997; Dou *et al.*, 2004). Die etwa 320 Aminosäuren umfassende, hochkonservierte Helikasedomäne ist allen bisher untersuchten RecQ-Helikasen gemeinsam, sowie meistens auch die RecQ-Ct-Region (RecQ C-terminal) und in einigen Fällen die HRDC-Domäne (Helicase and RNaseD C-terminal). Die RecQ-Ct-Domäne kommt nur in der Familie der RecQ-Helikasen vor und spielt nach aktuellem Wissensstand eine Rolle bei der Interaktion mit anderen Proteinen. Die HRDC-Domäne hingegen, die man außerdem auch in der RNaseD-Familie findet, scheint an der stabilen Bindung der DNA beteiligt zu sein. Sieben (I, Ia, II, III, IV, V, VI) konservierte Sequenzmotive der Helikasedomäne treten in verschiedenen Familien von DNA- und RNA-Helikasen auf, das mit 0 bezeichnete Sequenzmotiv hingegen ist charakteristisch für die RecQ-Familie, und scheint der transienten DNA-Bindung zu dienen (Bernstein und Keck, 2003). Zwischen den konservierten Domänen liegende Sequenzen variieren unter den RecQ-Proteinen

stärker, was vermuten lässt dass sie für andere Aktivitäten und Spezifitäten durch Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich sind (Hartung *et al.*, 2000).

Neben der biochemischen Untersuchung isolierter RecQ-Proteine, sowie zellbiologischen Ansätzen, dienen vor allem auch Mutanten der verschiedenen Modellorganismen, in denen entsprechende RecQ-Gene beeinträchtigt sind, zur Aufklärung der spezifischen Funktionen.

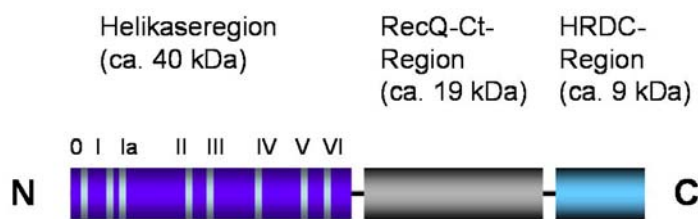


Abbildung 1: Schematische Zeichnung des RECQ-Proteins von *E. coli*

Die acht Motive der Helikase-Domäne sind als hellblaue Striche dargestellt (0-VI). Die drei Domänen sind unter den RecQ-Helikasen verschiedenster Organismen hochkonserviert (verändert nach Morozov *et al.*, 1997).

1.1.2 Eukaryotische Homologe und ihre Mutanten

Zu beobachten vor welche Probleme ein Organismus gestellt wird, wenn ein bestimmtes Gen nicht mehr funktionsfähig ist, kann bedeutend zu der Aufklärung einzelner Genfunktionen beitragen. Drei der fünf menschlichen RecQ-Gene stehen, wenn Mutationen darin vorliegen, mit schweren Erbkrankheiten in Verbindung, denen allen eine starke Disposition zum Auftreten verschiedener Formen von Krebs gemeinsam ist (Übersicht in Mohaghegh, 2001). Zwei von ihnen, genannt Bloom- und Werner-Syndrom, werden auch als segmentale Progerias bezeichnet, da einige, aber nicht alle ihrer Merkmale den Krankheiten entsprechen, die typischerweise mit der normalen Alterung des Menschen gehäuft auftreten (Übersicht in Brosh und Bohr, 2007).

Bei Patienten, die am Bloom-Syndrom leiden, ist die extrem hohe Neigung zur Krebsentstehung auf die drastisch gesteigerte somatische Rekombination zurückzuführen, weshalb alle Teile des Körpers theoretisch gleichermaßen betroffen sein können. Hier wird also, wenn auch in stark erhöhtem Maße, das Spektrum an Krebsformen widergespiegelt, wie es auch in der Normalbevölkerung auftritt. Verantwortlich für die Krankheit kann beispielsweise eine Punktmutation in der RecQ-Ct-Domäne sein, wenn eine für die Bindung von Zink zuständige Region betroffen ist. Diese Zink-Bindedomäne spielt eine Rolle bei der DNA-Bindung, der korrekten Faltung und der Stabilität des Proteins (Guo *et al.*, 2005; Übersicht in Brosh und Bohr, 2007). Das vollständige Protein umfasst 1417 Aminosäuren und wird bei genotoxischem Stress in Form von ionisierender Strahlung und DNA-schädigenden Agenzien induziert (Bachrati und Hickson, 2003). Neben typischen Hautveränderungen, Immundefizienz sowie reduzierter Fertilität ist ein charakteristisches äußeres Merkmal von Bloom-Patienten Kleinwüchsigkeit (German, 1969).

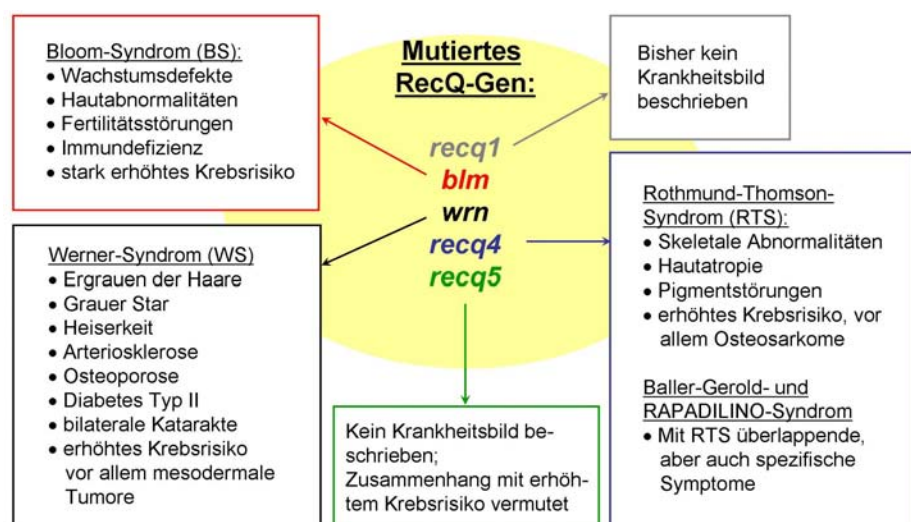
Das Werner-Syndrom zeichnet sich durch verfrühte Alterung ab dem Jugendalter und damit verbundenen Merkmalen aus, die bei Patienten ohne diesen Defekt erst in höherem Alter typischerweise auftreten. Darin eingeschlossen sind Symptome wie verfrühtes Erschlaffen der Haut und Ergrauen der Haare, sowie der Abbau des subcutanen Fettgewebes. Auch findet man schon bei jungen WS-Patienten Krankheiten wie Diabetes mellitus (Typ II), Osteoporose und Probleme des Herz-Kreislaufsystems, Probleme die in der Normalbevölkerung als alterstypisch einzuordnen sind. Zwei Symptome, die bei allen WS-Fällen diagnostiziert werden, sind der sogenannte „Graue Star“, der sich durch ein Trüben der Augenlinse bemerkbar macht, und Heiserkeit (Rosenthal *et al.*, 1996).

Zurückzuführen sind diese Merkmale auf Probleme bei der Auflösung aberranter DNA-Strukturen, die in Replikation, Reparatur und Rekombination auftreten, und in der gesunden Zelle Substrate des intakten WRN-Proteins sind (Yu *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2000; Übersicht in Brosh und Bohr, 2007). Das 1432 Aminosäuren umfassende WRN-Protein besitzt im Gegensatz zu den anderen RecQ-Helikasen eine Exonuklease-Domäne im N-terminalen Bereich, die drei konservierte Bereiche aufweist und Nukleinsäuren in 3'-5'-Richtung abbaut (Shen *et al.*, 1998).

Menschen, die mit dem Rothmund-Thomson-Syndrom leben müssen, weisen neben der ebenfalls stark erhöhten Krebsdisposition typischerweise Abnormalitäten an Haut und Skelett auf. Dabei ist die Haut oftmals stark photosensitiv. Das vom Defekt betroffene Gen ist in diesem Fall das der DNA-Helikase RECQ4 (Kitao *et al.*, 1999), dessen Mutation neben dem Rothmund-Thomson-Syndrom zwei zusätzliche Krankheiten, das RAPADILINO- (radial hypo-/aplasia, patellae hypo-/aplasia and cleft or highly arched palate, diarrhoea and dislocated joints, little size and limb malformation, nose slender and normal intelligence) und das Baller-Gerold-Syndrom, hervorrufen kann (Siitonen *et al.*, 2003; van Maldergem *et al.*, 2006).

Abbildung 2: Mit RecQ-Mutationen des Menschen assoziierte Krankheitsbilder

Neben erhöhten Risiken der Entstehung verschiedener Krebsformen weisen die Syndrome spezifische Merkmale auf. Für *recq1* und *recq5* wurden bisher keine Krankheitsbilder beschrieben. Erläuterungen und Quellenangaben sind dem Text zu entnehmen.



Zwei weitere RecQ-Helikasen sind im menschlichen Genom kodiert, RECQ1 und RECQ5. Über Krankheiten, die durch ihr Fehlen möglicherweise hervorgerufen werden, ist bisher wenig bekannt.

Allerdings konnte an Mäusen gezeigt werden, dass RECQ5 eine Rolle bei der Unterdrückung von Crossover-Ereignissen während der Mitose spielt. Ein Fehlen dieser DNA-Helikase führt zu erhöhten Raten an Schwesterchromatidaustausch, und damit bei Säugern zu einem erhöhten Risiko der Entstehung von Krebs (Wang *et al.*, 2003). Der Effekt wird durch eine zusätzliche Mutation in *BLM* verstärkt, weshalb man vermutet, dass BLM und RECQ5 sich in ihrer Funktion stark ähneln, und dabei an verschiedenen Wegen der HR-Unterdrückung beteiligt sind (Hu *et al.*, 2005). Mit Hilfe des aufgereinigten Proteins konnte gezeigt werden, dass RECQ5 abhängig von ATP und RPA (Replication Protein A) die RAD51-vermittelte Ausbildung von D-Loops verhindert, und dabei direkt mit RAD51 interagiert (Hu *et al.*, 2007).

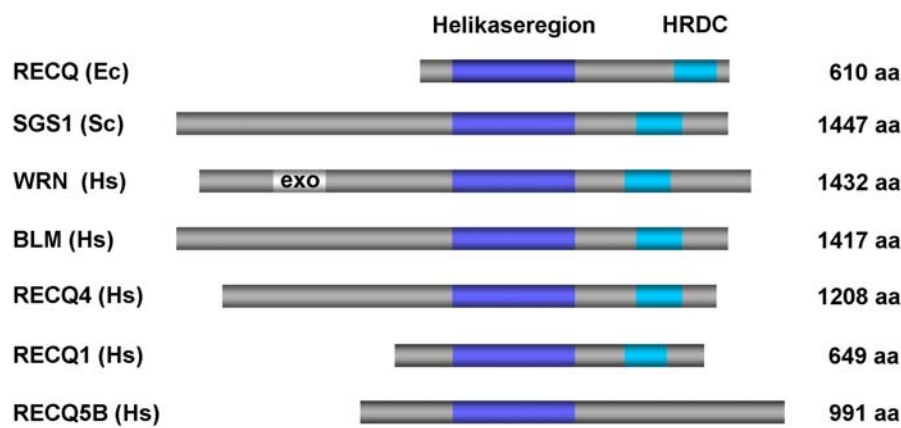


Abbildung 3: RecQ-Proteine von *E. coli*, *S. cerevisiae* und *H. sapiens*

Die konservierten Domänen sind schematisch dargestellt. Im menschlichen WRN-Protein ist zusätzlich eine Exonukleasefunktion enthalten (nach Hartung und Puchta, 2006). Von RECQ5 ist nur die größte von drei Isoformen dargestellt, RECQ5B (Shimamoto *et al.*, 2000).

Die molekularen Mechanismen, die beim Menschen im Zusammenhang mit dem Fehlen bestimmter RecQ-Funktionen zu den oben genannten Krankheiten führen, wurden inzwischen in einigen Modellorganismen anhand zahlreicher RecQ-Homologe untersucht. So lassen sich auf zellulärer Ebene bestimmte Merkmale der Mutanten in ganz unterschiedlichen Organismen wiederfinden und als allgemein RecQ-typisch einordnen. Dazu gehört die bereits im Zusammenhang mit den menschlichen Homologen erwähnte erhöhte HR-Frequenz, sowie Sensitivitäten gegenüber bestimmten DNA-schädigenden Agenzien. Letztere sind auf die Funktion der RecQ-Proteine in der Reparatur der Schäden zurückzuführen, die durch die jeweilige Substanz verursacht werden.

Die einzige RecQ-Helikase in *S. cerevisiae* ist SGS1, ein Protein bestehend aus 1447 Aminosäuren. Bei Mutanten, denen diese Helikase fehlt, ist die Lebensspanne verkürzt (Sinclair *et al.*, 1997), und die Zellen sind sensitiv gegenüber UV-Strahlung und den genotoxischen Agenzien Methylmethansulfonat (MMS) und Hydroxyurea (Yagamata *et al.*, 1998; Mullen *et al.*, 2000). MMS kann durch Methylierung der Nukleotide zu veränderter Basenpaarung und einer Behinderung der Replikation führen (siehe auch 1.2.1), wenn entsprechende Schäden nicht zuvor mit Hilfe der Nukleotidaustausch-Reparatur (NER) behoben werden (Knippers, 2001; Tercero und Diffley, 2001). Hingegen verursacht Hydroxyurea eine Limitierung der DNA-Synthese, indem durch die Hemmung der M2-Untereinheit der Ribonukleotidreduktase die Anzahl der zur Verfügung stehenden Bausteine eingeschränkt wird

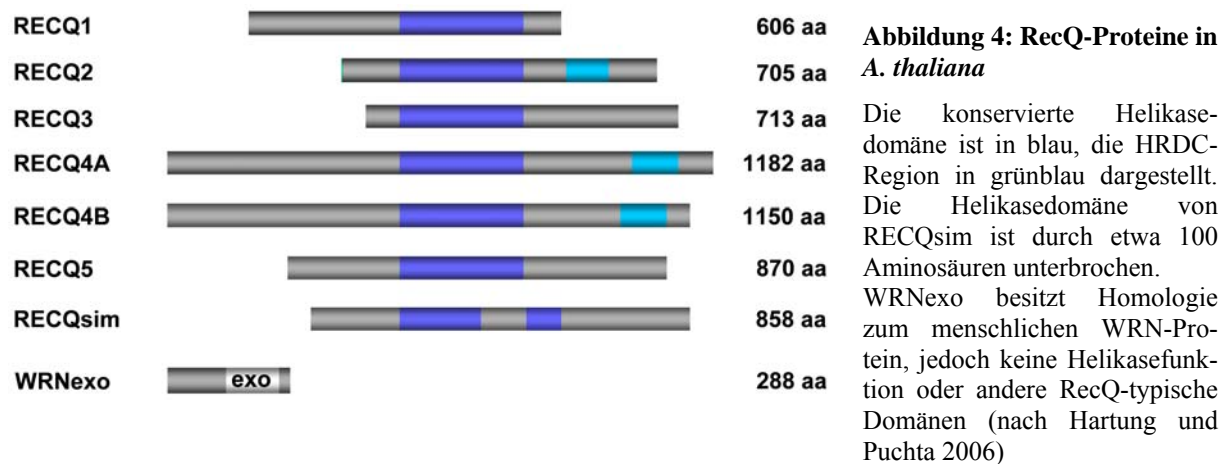
(Hurta und Wright, 1990). Mutanten von SGS1 weisen außerdem erhöhte Raten an illegitimer und homologer Rekombination auf und spiegeln damit die CO-unterdrückende Funktion von RecQ-Helikasen wieder, wie sie beispielsweise auch für die RecQ-Homologe des Menschen beschrieben wurde (Yagamata *et al.*, 1998; Watt *et al.*, 1996; Sinclair *et al.*, 1997; Übersicht in Bagherieh-Najjar, 2004).

In der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* wurde bei Mutanten der RecQ-Helikase RQH1 ebenfalls Sensitivität gegenüber Hydroxyurea nachgewiesen, die sich in der Schwierigkeit äußert, nach einem Replikationsblock (ausgelöst durch Replikationsinhibitoren oder DNA-Schäden) wieder in den normalen Zellzyklus überzugehen (Stewart *et al.*, 1997). Notwendig für die in den *rqh1*-Zellen gestörte Aufhebung dieses S-Phase-Arrests ist die RecQ-typische Funktion des RQH1-Proteins, übermäßige Rekombination zu unterdrücken. Dabei wird vor allem HR zwischen Schwesterchromatiden unterdrückt, wofür allerdings die Helikaseaktivität des Proteins nicht erforderlich ist (Hope *et al.*, 2006). 2005 wurde ein zweites RecQ-Homolog der Spaltheefe beschrieben, das bezüglich seiner Größe von über 2000 Aminosäuren alle bisher identifizierten RecQ-Helikasen übertrifft. Das dem menschlichen WRN-Protein stark homologe, sogenannte SPAC212.11 wird im subtelomeren Bereich kodiert, und seine Expression wird in Telomerase-defizienten Zellen hochreguliert. Dem Protein wird eine Funktion beim Erhalt der Telomere zugeschrieben (Mandell *et al.*, 2005).

Wie auch beim Menschen wurden fünf RecQ-Gene im Genom von *Drosophila melanogaster*, und vier in *Caenorhabditis elegans* identifiziert. Die höchste bisher beschriebene Anzahl von RecQ-Homologen findet man allerdings im Pflanzenreich, mit bis zu acht RecQ-Helikasen beim Reis (Hartung, unveröffentlichte Daten) oder sieben in der hier untersuchten Ackerschmalwand (Übersicht in Hartung und Puchta, 2006). Unter monokotylen und dikotylen Pflanzen blieben im Laufe der Evolution interessanterweise die Intron-Positionen von insgesamt sechs verschiedenen orthologen RecQ-Genen nahezu identisch, was eine starke strukturelle Konservierung der Gene über eine Zeitspanne von mehr als 150 Millionen Jahren bedeutet. Als Besonderheit findet man in Brassicaceen ein dupliziertes Genpaar unter den RecQ-Genen, *RECQ4A* und *4B*. Beide weisen noch sehr hohe Sequenzähnlichkeiten auf und ähneln gleichzeitig am stärksten den in Mensch und Hefe für BLM und SGS1 kodierenden Genen. RECQsim stellt unter den RECQ-Proteinen aus *A. thaliana* insofern eine Besonderheit dar, dass die hier vorliegende Helikasedomäne durch eine Insertion von etwa 100 Aminosäuren unterbrochen ist (Hartung *et al.*, 2000). Dass das Protein dennoch RecQ-typische Funktionen erfüllt, konnte die Arbeitsgruppe um Bagherieh-Najjar *et al.* anhand von SGS1-Mutanten der Bäckerhefe zeigen, deren MMS-Sensitivität sich durch die Expression von RECQsim aus *A. thaliana* kompensieren lässt (Bagherieh-Najjar *et al.*, 2003). Über die weiteren in *A. thaliana* existierenden RecQ-Gene, *RECQ1*, 2, 3 und 5 ist noch relativ wenig bekannt. Für RECQ2 konnte allerdings mit Hilfe der „Yeast-Two-Hybrid“-Methode gezeigt werden, dass das Protein mit WRNexo

interagiert, einer Exonuklease mit Homologie zum N-Terminus der menschlichen RecQ-Helikase WRN (Hartung *et al.*, 2000).

Die RecQ-Proteine von *A. thaliana* sind schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Bisher publizierte Daten sollen in einem späteren Kapitel vor dem Hintergrund der Rollenverteilung in der DNA-Reparatur und als mögliche Interaktionspartner eines potenziellen RTR-Komplexes in Pflanzen detaillierter diskutiert werden. Dabei soll sich der Focus auf das duplizierte Genpaar *RECQ4A* und *4B* richten.



1.1.3 Biochemische Eigenschaften

Durch die biochemische Charakterisierung von Substraten und Produkten der interessierenden Proteine kann im Zusammenspiel mit genetischen Ansätzen ihre funktionelle Zuordnung zu bestimmten Stoffwechselwegen erfolgen. Besonders interessant ist dabei, wie im Falle von RecQ-Helikasen, der evolutionäre Aspekt der Etablierung mehrerer Homologe innerhalb eines einzelnen Organismus. So wurden bereits zahlreiche RecQ-Proteine verschiedener Modellorganismen aufgereinigt und in Hinblick auf ihre biochemischen Eigenschaften untersucht.

Ganz allgemein sind RecQ-Helikasen Enzyme, die bezogen auf den Strang an den sie gebunden sind, in 3'-5'-Richtung abhängig von ATP und dem Cofaktor Mg^{2+} doppelsträngige DNA entwinden. Dabei wird die ATPase-Aktivität durch die Motive I und II der Helikasedomäne dargestellt, die auch als Walker A und B Motive bezeichnet werden und ebenso in anderen ATP-abhängigen Enzymen enthalten sind (Walker *et al.*, 1982).

Abgesehen von SGS1 der Bäckerhefe (Bennett *et al.*, 1998) besitzen viele der bisher daraufhin untersuchten RecQ-Proteine (z.B. WRN, RECQ1 und RECQ4 des Menschen) höhere ATPase-Aktivität an einzelsträngiger DNA (ssDNA, single stranded) verglichen mit doppelsträngiger (dsDNA,

double stranded), und bevorzugen dabei lange ssDNA-Abschnitte gegenüber kürzeren (Orren *et al.*, 1999; Brosh *et al.*, 2000; Macris *et al.*, 2006). Deshalb geht man davon aus, dass sie über lange Strecken an einen Einzelstrang gebunden sind und an diesem entlang laufen bis sie auf ihre eigentlichen Substrate treffen. So konnte für die fünf RecQ-Proteine des Menschen, mit Ausnahme von RECQ4, tatsächlich eine Helikaseaktivität *in vitro* nachgewiesen und schließlich genauer charakterisiert werden (Macris *et al.*, 2006).

Die bisher untersuchten RecQ-Proteine stellen individuelle Anforderungen bezüglich ihrer Reaktionsbedingungen, wie der Konzentration von ATP im Verhältnis zu Mg^{2+} oder der Ersetzbarkeit des Kofaktors durch andere zweiwertige Metallionen (Harmon und Kowalczykowski, 2001; Choudhary *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005; Kobbe *et al.*, 2008).

Außerdem unterscheiden sich die jeweiligen bevorzugten Substrate gemäß der Spezialisierung einzelner RecQ-Proteine auf verschiedene Prozesse in der Replikation, Reparatur und Rekombination der DNA. Dabei werden die Erwartungen oftmals durch genetische Ansätze gegeben, z.B. anhand von Sensitivitäten der Mutanten gegenüber bestimmten DNA-Schadenstypen. Die Substratspezifitäten werden dann vorwiegend in sogenannten „Strand-Displacement-Assays“ mit Hilfe künstlich hergestellter DNA-Strukturen untersucht, an denen einzelne (z.B. radioaktiv) markierte Stränge nach Ablösung durch die RecQ-Helikasen nachgewiesen werden können. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass das WRN-Protein effizient eine hinter einem Streptavidin-Block liegende Gabelstruktur entwindet, sowie dsDNA-Substrate mit 5'-Überhängen wie sie während der Okazakifragment-Synthese in der Replikation, oder auch in Reparaturprozessen entstehen (Brosh *et al.*, 2002). Ein Zusammenhang zwischen WRN und dem Multienzymkomplex der Replikation konnte bei Mäusen dadurch bestätigt werden, dass erstens beide gemeinsam aufgereinigt werden konnten, und zweitens Mutanten des WRN-Gens Sensitivität gegenüber Camptothecin aufweisen, einem spezifischen Inhibitor der in die Replikation involvierten Topoisomerase I (Lebel und Leder, 1998).

Schlüsselintermediate, an denen einige der bisher charakterisierten RecQ-Proteine wirken (siehe Abbildung 5; Übersicht in Sharma *et al.*, 2006), sind Holliday-Strukturen und D-Loops, wobei für die menschlichen BLM- und WRN-Proteine gezeigt werden konnte, dass sie die Holliday-Struktur in einem als „Branch Migration“ bezeichneten Prozess sogar um mehr als 2,5 Kilobasen verschieben können. Dabei wird für BLM eine anti-rekombinogene Funktion an stehengebliebenen Replikationsgabeln (siehe 1.2.1) diskutiert (Constantinou *et al.*, 2000; Karow *et al.*, 2000).

D-Loops entstehen z.B. in der homologen Rekombination (HR) durch die RAD51-vermittelte Einzelstrang-Invasion in den homologen Duplex, und werden beispielsweise durch BLM (van Brabant *et al.*, 2000), WRN (Orren *et al.*, 2002) und HsRECQ1 (Sharma *et al.*, 2005) prozessiert. Daher wird für WRN eine entsprechende Funktion bei der Entwindung des telomerischen T-Loops diskutiert, die hier gemeinsam mit der Exonukleasefunktion des Proteins eine Rolle spielt (Opresko *et al.*, 2004). In einer ersten Studie zur biochemischen Charakterisierung pflanzlicher RecQ-Helikasen konnte gezeigt werden, dass RECQ2 aus *A. thaliana* ebenfalls D-Loops entwindet. Es wird vermutet, dass dieses

Protein ein pflanzliches Ortholog der Helikasefunktion des menschlichen WRN-Proteins darstellt (Kobbe *et al.*, 2008).

Unter Zellzyklus-abhängiger Kontrolle an den Telomeren (Zahler *et al.*, 1991; Paeschke *et al.*, 2005), sowie in den Promotorelementen vieler Gene kommen Guanin-reiche Sequenzabschnitte vor, aus denen häufig viersträngige G4-Quadruplex-Strukturen entstehen. Diese können einerseits die genomische Stabilität gefährden. Andererseits wird aber auf Transkriptionsebene eine regulatorische Funktion der G4-Strukturen z.B. für menschliche Promotorregionen vorhergesagt (Huppert und Balasubramanian, 2008), die ebenfalls eine gezielte Bildung und Wiederauflösung erfordert. Die menschlichen WRN- und BLM-Proteine, sowie SGS1 aus *S. cerevisiae* und RECQ aus *E. coli* entwinden nachweislich solche G4-Strukturen, wobei BLM und SGS1 diese sogar im Vergleich zu doppelsträngiger DNA und Holliday-Strukturen bevorzugen (Übersicht in Sharma *et al.*, 2006).

Die oben genannten Strukturen entstehen vor allem im Zuge von Rekombination, Replikation und der Reparatur spezifischer DNA-Schäden. Daher steht eine solche funktionelle Einordnung der RecQ-Helikasen im Einklang mit den in diversen Mutanten beobachteten Hyperrekombinations- und Sensitivitäts-Phänotypen.

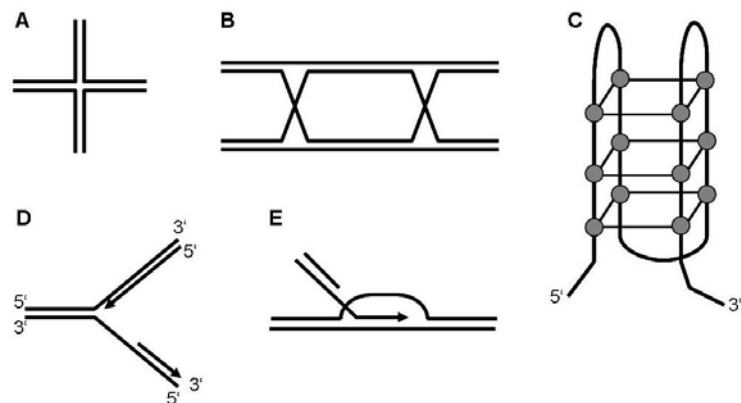


Abbildung 5: Substrate der RecQ-Helikasen

Typische DNA-Strukturen, für die Aktivitäten diverser RecQ-Proteine nachgewiesen wurden, sind schematisch dargestellt: Holliday-Struktur (A), doppelte Holliday-Struktur (B), G4-Quadruplex (C), Replikationsgabel (D) und D-Loop (E).

1.2 Der RTR-Komplex im Kontext der DNA-Reparatur

Entsprechend der in diversen Mutanten beobachteten Phänotypen und der aus biochemischen Studien an isolierten Proteinen erhaltenen Daten wurden die RecQ-Helikasen in verschiedene Wege der DNA-Reparatur und –Rekombination eingeordnet. Über diese Mechanismen soll im Folgenden zunächst ein Überblick verschafft, und dabei der Schwerpunkt auf DSB-Reparatur und Rekombination gesetzt werden. Im nächsten Schritt erfolgt eine Einordnung der bisher bekannten und vorhergesagten Funktionen von RecQ-Helikasen in die aktuellen Modelle dieser DNA-Reparaturwege.

1.2.1 Wege der DNA-Reparatur

Verschiedene externe und interne Einflüsse setzen das Erbgut einer Zelle permanenter Schädigung aus und erfordern Reparatur-Wege, die auf die jeweiligen Schadenstypen genau abgestimmt sind.

Pflanzen sind aufgrund ihrer Bindung an den jeweiligen Standort vor allem Schädigung durch UV-Strahlung ausgesetzt. Die dabei häufig erzeugten Thymindimere werden im Licht durch das Enzym Photolyase gespalten (Übersicht in Tuteja *et al.*, 2001), das 1984 erstmals aus *E. coli* isoliert und biochemisch charakterisiert wurde (Sancar *et al.* 1984). Nur wenige Jahre später konnte das Enzym ebenfalls aus Blattextrakten von *A. thaliana* isoliert und sein Absorptionsspektrum mit denen der Photolyasen aus *E. coli* und *S. cerevisiae* verglichen werden (Prang und Hays, 1991). Obwohl die Theorie bereits lange Zeit diskutiert wurde, fehlte bis 2005 der tatsächliche Beweis für den genauen Ablauf der Spaltung, der auf einem radikalischen Elektronentransfer-Mechanismus beruht (Sancar *et al.*, 1984; Kao *et al.*, 2005). In *A. thaliana* wird neben der Pyrimidin-Dimere spaltenden Photolyase eine zusätzliche exprimiert, die andere Substratspezifitäten aufweist; zudem besitzen vier weitere vorhergesagte Gene der Ackerschmalwand Homologien zu Photolyasen (Übersicht in Britt, 2002).

Von außen einwirkende genotoxische Agenzien führen ebenfalls zu bestimmten Klassen von DNA-Schäden und lassen sich neben ihrer ökologischen, negativen Bedeutung auch gezielt und positiv im Labor einsetzen, um die entsprechenden Reparaturwege zu studieren. Allerdings finden auch im Zuge des normalen Stoffwechsels innerhalb der Zelle Beschädigungen des Erbguts statt. So führen reaktive Sauerstoffspezies, die während der Atmung permanent als Nebenprodukt entstehen, zu potenziell mutagenen Veränderungen der Basen, sowie zu einzelsträngigen Lücken im DNA-Rückgrat (Übersicht in Lieber und Karanjawala, 2004).

Für direkt beschädigte Nukleotide stehen neben der an Pyrimidindimeren wirkenden Photolyase weitere Reparaturmechanismen wie z.B. die Excisionsreparatur zur Verfügung, bei der wiederum zwischen Basen- und Nukleotidexcisionsreparatur unterschieden wird (Übersicht in Britt, 2002). Trifft

allerdings die Replikationsmaschinerie noch vor der Reparatur auf eine solche Schadstelle, kann es entweder durch fehlerhafte Erkennung der Basen zu einem Fehleinbau und dadurch zu möglichen Mutationen kommen, oder aber zu einer Blockierung der Replikation. Für einen auf den Folgestrang beschränkten Schaden wird anhand von *E. coli* ein Modell diskutiert, in dem dieser abhängig von der Synthese der Okazakifragment übergangen wird. Der daraus resultierende, hinter der Gabel zurückbleibende einzelsträngige Bruch kann anschließend durch Rekombination mit dem intakten Schwesterchromatid geschlossen werden. Eine ähnliche Situation ist denkbar, wenn die Replikationsgabel direkt auf einzelsträngige Lücken im Folgestrang trifft, ausgelöst z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies (Übersicht in Lieber und Karanjawala, 2004). Der diskontinuierlichen Folgestrang-Replikation stehen größere Schwierigkeiten gegenüber, wenn der Schaden alternativ den Leitstrang betrifft. Bevor die Replikation hier neugestartet werden kann, kommt es zu einem echten Block, der entweder durch eine Umgehung des Schadens mit Hilfe sogenannter Transläsions-Polymerasen, oder aber durch eine tatsächliche Reparatur und Neuanlagerung eines Replisoms behoben werden kann. Die beschriebenen Formen von Schäden, die während der Replikation zu Problemen führen, sind in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

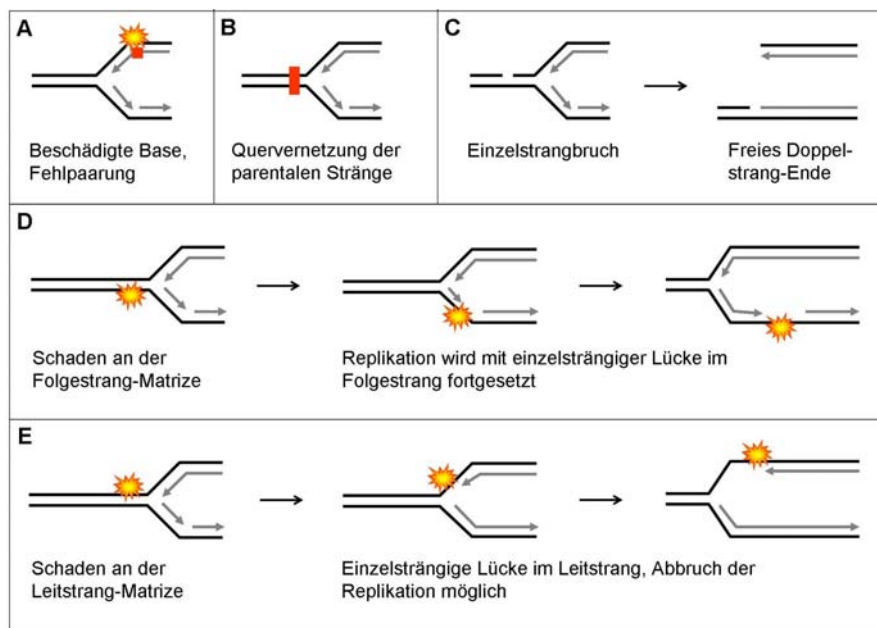


Abbildung 6: Typische Schäden, wie sie an Replikationsgabeln auftreten

Beschädigte Basen können durch Fehlpaarungen zu Mutationen führen (A), oder eine Quervernetzung der Stränge zum Abbruch der Replikation (B). Einzelstrangbrüche können hinter der Gabel zu DSBs umgesetzt werden (C). Ob die Replikation zu einem Abbruch kommt oder der Schaden zunächst übergangen werden kann, hängt auch davon ab, welcher der parentalen Stränge betroffen ist (D, E). (Nach McGlynn und Lloyd, 2002)

Mechanismen für die Reparatur solcher angehaltenen Replikationsgabeln wurden für *E. coli* beschrieben und wurden von McGlynn and Lloyd 2002 zusammengefasst: Schlüsselmerkmal ist dabei die Ausbildung einer Holliday-Struktur, die durch ein leichtes Aufwinden der stehengebliebenen Gabel und die Aneinanderlagerung der beiden neusynthetisierten Tochterstränge sowie der beiden parentalen Stränge entsteht, und in diesem Fall auch als „Chickenfoot“-Struktur bezeichnet wird (Abbildung 7).

Das aus den einander angelagerten Tochtersträngen entstandene doppelsträngige Ende kann in *E. coli* mit Hilfe der Rekombinase RecA in den der Gabel voraus liegenden Doppelstrang einwandern und mit diesem einen D-Loop ausbilden. Im Anschluss kann hier ein neues Replisom aufgeladen und an der ursprünglichen Gabel die Holliday-Struktur durch RuvABC aufgelöst und die Stränge anschließend religiert werden. Alternativ kann RuvABC direkt

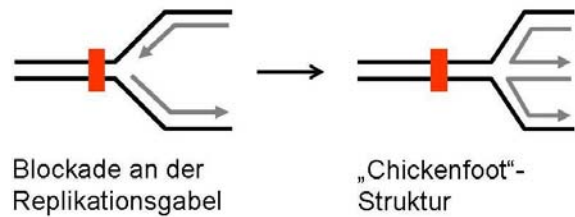


Abbildung 7: „Chickenfoot“-Struktur

Beispielsweise eine chemische Quervernetzung kann zu einer Blockierung der Replikationsgabel und der Ausbildung einer HJ führen. Diese wird hier auch als „Chickenfoot“-Struktur bezeichnet (Nach McGlynn und Lloyd, 2002).

die an der Gabel entstandene Holliday-Struktur prozessieren, wodurch einer der Tochterstränge als doppelsträngiges DNA-Ende frei gelassen wird. Ebenfalls durch Rekombination mit dem der ursprünglichen Blockade voraus liegenden Chromosom wird schließlich eine neue Replikationsgabel gebildet. In beiden Fällen besteht ein hohes Risiko fehlerhafter Rekombination durch Homologien an anderen Orten im Genom, besonders im Falle der zweiten Variante, in der vorübergehend ein freies DNA-Ende entsteht. Für die als „Erhalter der genomischen Stabilität“ deklarierten RecQ-Helikasen wird an dieser Stelle eine anti-rekombinogene Funktion diskutiert. Dabei wird die „Chickenfoot“-Struktur durch einen als „Branch Migration“ bezeichneten Prozess wieder in Richtung der Gabelstruktur aufgelöst (Karow *et al.*, 2000; Übersicht in Sharma *et al.*, 2006). Dass stehengebliebene Replikationsgabeln aber alternativ auch bei Eukaryoten tatsächlich über Ausbildung und Schneiden von HJs prozessiert werden, wurde bisher zwar nicht direkt bewiesen, allerdings besitzen sie analog zu RuvABC die Endonuklease MUS81. Dieses von Hefe bis zum Menschen konservierte Protein bearbeitet als Heterodimer gemeinsam mit MMS4 (in Hefe) bzw. EME1 (in Tieren und Pflanzen) Holliday-Strukturen und führt bei einer Mutation in der Bäckerhefe aufgrund seiner Funktion in der meiotischen Rekombination unter anderem zu reduzierter Lebensfähigkeit der Sporen (Boddy *et al.*, 2001).

Ob für die an der stehengebliebenen Replikationsgabel ausgebildete „Chickenfoot“-Struktur eine endonukleolytische Auflösung notwendig ist, hängt vor allem von der Art des Schadens ab und ist wahrscheinlich, wenn zugleich beide parentalen Stränge betroffen sind. Beispiele für Mutagene, die zu solchen Schäden führen können, sind sogenannte „Crosslinker“ wie Mitomycin C (MMC) oder cis-Platin. Die Wirkung dieser beiden auch als Chemotherapeutika eingesetzten Substanzen unterscheidet sich vor allem darin, dass MMC durch sequenzabhängige kovalente Bindung an die 2'-Aminogruppe des Guanins sowohl Intra- als auch Interstrang-Verknüpfungen, sowie einfache Addukte hervorruft. Die Quervernetzung der Stränge resultiert im Einklang mit den beschriebenen Modellen häufig in Einzel- und Doppelstrangbrüchen, wahrscheinlich dann wenn die Replikationsgabel auf einen Schaden trifft. Zudem wird bei der Vernetzung innerhalb eines Stranges eine leichte Beugung der DNA bis hin zu etwa 15° verursacht (Rink *et al.*, 1996; De Silva *et al.*, 2000; Übersicht in McGlynn und Lloyd,

2002). Das Hauptprodukt von cis-Platin hingegen sind vor allem verknüpfte benachbarte Guanine innerhalb eines Stranges, die durch eine stärkere Beugung der Stränge bis maximal 55° die Erkennung durch Reparaturmechanismen wie NER oder Mismatch Repair aktivieren (Übersicht in Boulikas und Vougiouka, 2003).

Der DNA-Schadenstyp, der für ein Genom die höchsten Risiken mit sich bringt, ist der Doppelstrangbruch (DSB), dessen Reparatur je nach Mechanismus schwerwiegende Folgen für Sequenzabfolge und Chromosomenorganisation haben kann. Den durch Pyrimidindimere, Einzelstrangbrüche oder sonstige Blockaden an angehaltenen Replikationsgabeln verursachten DSBs stehen solche gegenüber, die direkt durch Einfluss von Mutagenen wie Bleomycin, oder beispielsweise durch Gamma-Strahlung, induziert werden.

Solche klassischen Doppelstrangbrüche werden in Pflanzen zum größten Teil über das sogenannte NHEJ (Non Homologous End Joining), die nicht-homologe Reparatur beseitigt, einen Prozess in dem mit Hilfe der Schlüsselproteine KU70/KU80 und Ligase 4 die Bruchenden wieder verknüpft werden (Übersicht in Weterings und Chen, 2008). Da für diese Verknüpfung keine längeren homologen Bereiche erforderlich sind, können genomische Veränderungen die Folge sein (Tamura *et al.*, 2002). Zudem kommt es beim NHEJ oft zu Deletionen oder Insertionen; bei letzteren werden beliebige, an anderen Orten im Genom vorkommende, nicht homologe Sequenzen in die Bruchstelle eingefügt (Chu, 1997; Puchta, 1999).

Die homologe Rekombination hingegen ist ein konservativer Reparaturmechanismus, da die Basenabfolge mit Hilfe homologer Sequenzen des Schwesterchromatid oder des homologen Chromosoms erhalten werden kann. Dabei dient der intakte, homologe DNA-Strang (Donor) als Matrize zum Einbau fehlender Basen, so dass es bei gleichen Allelen zu keiner Veränderung des ursprünglichen Gens kommt. Die Mechanismen der homologen DSB-Reparatur sollen in Abschnitt 1.2.3 vertiefend diskutiert werden. Als „Synthesis Dependent Strand Annealing“ (SDSA) wird eine Variante der DSB-Reparatur bezeichnet, bei der eine Kombination von illegitimer und homologer Rekombination zum Tragen kommt; dabei wandert nur eines der beiden prozessierten Enden des Doppelstrangbruchs in einen homologen Doppelstrang ein und nutzt diesen als Matrize für die DNA-Synthese. Nach Verlängerung des Strangs wird dieser aber wieder vom homologen Molekül verdrängt und mit seinem ursprünglichen Partner verknüpft (Nassif *et al.*, 1994; Puchta, 1999; Olsen Krogh *et al.* 2004).

Die Gewichtung von nicht-homologer und homologer Rekombination variiert zwischen den Organismen stark, wobei in höheren Eukaryoten hauptsächlich NHEJ für die Reparatur von DSBs genutzt wird. Das Moos *Physcomitrella patens* stellt dabei durch die Nutzung von HR als bevorzugten DSB-Reparaturweg eine Ausnahme dar und eignet sich besonders zum Studium des Gene Targetings in Pflanzen (Übersicht in Schaefer, 2001). Die Tendenz jedoch, mit steigender Komplexität eher auf NHEJ zurückzugreifen, erscheint allein im Hinblick auf die jeweiligen Beschaffenheiten der Genome

sinnvoll. Der eigentlich Sequenz-erhaltende Weg der HR stellt vor allem die Genome komplexerer Eukaryoten vor besondere Schwierigkeiten, da hier ein großer Anteil an repetitiven Sequenzen, wie z.B. 5-7% beim Menschen, ein großes Risiko fehlerhafter Rekombination birgt. Zudem können Chromosomen-Translokationen die Folge sein (Johnson *et al.*, 2001). In der Meiose hingegen ist zur Neukombination des Erbguts HR notwendig, und wird gezielt induziert. Aufgrund des Schwerpunkts, der in dieser Arbeit auf somatischer und meiotischer HR liegt, sollen beide Varianten ausgehend vom Doppelstrangbruch in den folgenden Kapiteln vertiefend behandelt werden.

1.2.2 Der Doppelstrangbruch als Ausgangspunkt für HR

Der Reparatur von DNA-Brüchen, die in somatischen Zellen durch Fehler in der Replikation, Stoffwechselmetabolite oder äußere Einflüsse induziert werden, steht die Meiose gegenüber, in der gezielt induzierte Doppelstrang-Brüche (DSBs) die Orte der Rekombinationsereignisse zwischen beiden Chromosomensätzen eines diploiden Genoms darstellen.

Dabei steht die meiotische Teilung allein schon deshalb in starkem Kontrast zur mitotischen Teilung, weil anstelle nur einer hier zwei Teilungen auf nur eine einzelne S-Phase folgen. Genetische Information wird neu kombiniert und in den resultierenden vier haploiden Gameten untergebracht. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist SPO11, ein Protein mit Homologie zur Untereinheit A der archaebakteriellen Typ 2 -Topoisomerase TOP6, für den DSB-induzierenden Schritt essentiell (Bergerat *et al.*, 1997; Keeney *et al.*, 1997). Diese Funktion von einem SPO11-Protein ist im Tierreich ebenfalls konserviert und wird im Pflanzenreich sogar durch zwei homologe SPO11-Proteine ausgeführt. Im Genom der Ackerschmalwand sind insgesamt drei SPO11-Proteine kodiert, benannt als SPO11-1, -2 und -3 (Hartung und Puchta, 2000, 2001). Während die frühe Letalität einer *SPO11-3*-Mutation mit einer essentiellen Rolle des Proteins in der somatischen Endoreduplikation in Verbindung steht, zeigen Mutanten von *SPO11-1* und -2 im Vergleich zum Wildtyp bis hin zur Bildung von Schoten keine sichtbaren Wachstumsunterschiede (Hartung *et al.*, 2002, 2007; Sugimoto-Shirasu *et al.*, 2002; Sugimoto-Shirasu und Roberts, 2003; Stacey *et al.*, 2006). Für eine homozygote *SPO11-1*-Mutation konnten Grelon *et al.* 2001 zeigen, dass die Pflanzen nahezu steril sind. In ihrer meiotischen Teilung im Laufe der Pollenentwicklung findet keine Chromosomenpaarung statt, und anstelle der im Wildtyp in der Diakinese erzeugten Bivalente entstehen hier typischerweise Univalente, die zufällig verteilt werden (Grelon *et al.*, 2001). Interessanterweise ist die Einzelmutante *spo11-2* in ihrem meiotischen Phänotyp nicht von *spo11-1* zu unterscheiden (Stacey *et al.*, 2006; Hartung *et al.*, 2007), auch eine entsprechende Doppelmutante *spo11-1/spo11-2* weist keine weitere Verstärkung des Phänotyps, sondern die gleichen, für die Einzelmutanten beschriebenen Defekte auf. Dies führte zu der Folgerung, dass beide Proteine am gleichen Schritt beteiligt sind, oder gar in einem

einigen heterodimeren Komplex arbeiten, der für die Induktion meiotischer Doppelstrangbrüche in *A. thaliana* verantwortlich ist. Tatsächlich können *spo11-1* und *spo11-2* den durch *rad51* verursachten Phänotyp, der sich in einer starken Fragmentierung der Chromosomen in Anaphase I äußert, unterdrücken (Hartung *et al.*, 2007). Dadurch wird eine Funktion beider SPO11-Homologe, die noch vor der Invasion potenzieller Enden in den homologen Strang einzuordnen ist, bestätigt. Für diese Funktion ist zudem entscheidend dass beide SPO11-Proteine in einer katalytisch aktiven Form vorliegen, wie durch Komplementationsversuche an den Mutanten gezeigt werden konnte. Dabei kann der meiotische Phänotyp beider Mutanten zwar durch die für die vollständigen Proteine kodierenden Konstrukte aufgehoben werden, nicht aber durch Äquivalente, die jeweils im katalytisch aktiven Tyrosin-Rest eine Mutation tragen (Hartung *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zu dem konservierten meiotischen DSB-Induktionsfaktor SPO11, der schon relativ gut erforscht ist, sind die Informationen über andere an diesem frühen Schritt der Meiose beteiligte Proteine noch eher spärlich. Zusätzlich zu SPO11 sind in der Bäckerhefe zwar neun weitere Faktoren als essentiell für die DSB-Induktion beschrieben worden, namentlich Rad50, MRE11, XRS2, REC102, REC104, REC114, SKI8, MER2 and MEI4 (Keeney *et al.*, 2001). Allerdings konnten für die Proteine, die von ihnen überhaupt in *A. thaliana* kodiert sind (MRE11, RAD50, NBS1, SKI8), diese frühen meiotischen Funktionen nicht nachgewiesen werden. In der Hefe sind MRE11 und RAD50 zusätzlich zu ihren Funktionen bei der Ausbildung von Brüchen auch am sogenannten MRX-Komplex beteiligt (vergl. 1.2.3), der bereits entstandene DSBs prozessiert. Im Gegensatz zur eigentlichen DSB-Induktion sind diese sich ihr anschließenden Funktionen beider Proteine in *A. thaliana* konserviert (Bleuyard *et al.*, 2004; Puizina *et al.*, 2004). Unabhängig von den in Hefe bekannten Faktoren, wurde kürzlich ein zusätzliches Protein charakterisiert, das in *A. thaliana* essentiell für die Induktion meiotischer Doppelstrangbrüche ist. Dieses sogenannte PRD1 wurde zuvor erstmals in einem Screen nach meiotischen Mutanten entdeckt und führt in einem homozygot mutierten Hintergrund zu extrem reduzierter meiotischer Rekombination, dem Fehlen früher meiotischer Rekombinations-Marker wie dem Auftreten von DMC1-Foci, sowie einem mit *spo11-1* und *spo11-2* vergleichbaren meiotischen Phänotyp. Zudem kann auch *prd1* wie *spo11-1* oder *spo11-2* den meiotischen Phänotyp von *rad51* unterdrücken, der sich in einer starken Fragmentierung der Chromosomen äußert und seinerseits auf Defekte bei der Invasion der Enden in den homologen Strang zurückzuführen ist. Durch die „Yeast-Two-Hybrid“-Methode konnte tatsächlich eine Interaktion zwischen PRD1 und SPO11-1 festgestellt werden (Mercier *et al.*, 2001; De Muyt *et al.*, 2007).

Für SPO11 in Hefe konnten interessanterweise auch von der DSB-Induktion unabhängige Funktionen beschrieben werden, z.B. in der prä-meiotischen S-Phase, die sich bereits stark von der somatischen S-Phase unterscheidet, oder bei der Ausbildung des synaptonemalen Komplexes (Celerin *et al.*, 2000; Pawlowski und Cande, 2005; Hamant *et al.*, 2006).

Der DSB-Induktion schließt sich die Invasion der Enden in das homologe DNA-Molekül an, eine Schnittstelle zwischen meiotischer und somatischer Rekombination. Dennoch kann prinzipiell

zwischen beiden Prozessen unterschieden werden, wie im folgenden Kapitel zusammengefasst wird. Beteiligte Faktoren und die tatsächliche Nutzung der einzelnen Unterwege der HR können einerseits zwischen somatischer und meiotischer HR, andererseits aber auch zwischen verschiedenen Organismen, variieren.

1.2.3 Reparatur der DSBs durch somatische oder meiotische HR

An einem Doppelstrangbruch werden zu Beginn der HR zunächst die Enden durch den evolutionär hochkonservierten MR-Komplex prozessiert, der die Proteine MRE11 und RAD50 enthält und einzelsträngige 3'-Überhänge erzeugt. In der Hefe zeigen sowohl Mutanten dieser beiden Faktoren, als auch von XRS2, Defekte in der meiotischen Rekombination (Übersicht in Connelly und Leach, 2002). Zusammen bilden MRE11, RAD50 und XRS2 den sogenannten MRX-Komplex, analog zum menschlichen, aus MRE11, RAD50 und NBS1 bestehenden MRN-Komplex (Johzuka und Ogawa, 1995; Dolganov *et al.*, 1996; Maser *et al.*, 1997; Carney *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 1998; Trujillo und Sung, 2001).

Die einzelsträngigen Überhänge werden zunächst von RPA (Replication Protein A) überzogen, das Sekundärstrukturen beseitigt (Sugiyama *et al.*, 1997). Vermittelt durch RAD52 wird RPA wieder verdrängt und RAD51 an die DNA rekrutiert, wobei sich das RAD51-Nukleoproteinfilament ausbildet, das durch weitere RAD51-Paraloge stabilisiert wird (Sugiyama und Kowalczykowski, 2002; Fortin und Symington, 2002). RAD51 ist sowohl in somatische als auch meiotische Rekombination involviert und ist das eukaryotische funktionelle Homolog zum bakteriellen RECA (Shinohara *et al.*, 1992). Eukaryotische RAD51-Paraloge sind z.B. RAD55 und 57 in Hefe, oder RAD51B, C, D, XRCC2 und XRCC3 in Säugetieren. Letztere weisen zueinander sowie zu RAD51 selbst etwa 20-30 % Sequenzidentität auf (Übersicht in Sonoda *et al.*, 2001).

Das RAD51-Nucleoproteinfilament wandert nun unter Einfluss von RAD54 in einen homologen DNA-Duplex ein, entweder das Schwesterchromatid oder das homologe Chromosom. Dieses stellt somit das Donormolekül für die zu einer Verlängerung des eingedrungenen Stranges führenden DNA-Synthese dar (Übersicht in Symington, 2005; Kiiantsa *et al.*, 2006). In Abbildung 8 sind die beschriebenen frühen Schritte der homologen Rekombination schematisch dargestellt.

Für die Auflösung dieser Struktur, die durch die Invasion des freien DNA-Endes in den homologen Duplex und sich anschließende DNA-Synthese entsteht, wurden Modelle entwickelt, die theoretisch sowohl somatische als auch meiotische HR beschreiben können. Ihr tatsächliches Vorkommen und ihre Gewichtung in den unterschiedlichen Organismen muss allerdings im Einzelfall gesondert diskutiert werden, wofür durch genetische und biochemische Ansätze Hinweise geliefert werden.

Einerseits kann der eingedrungene Strang wieder aus dem Donor-Duplex herausgelöst und die nun aufgefüllte Lücke durch Ligation mit dem anderen Ende des Bruchs geschlossen werden, was dann als SDSA bezeichnet, vor allem für somatische Zellen beschriebenen Zweig der HR darstellt (siehe auch Abschnitt 1.2.1). Dabei wird die HJ-Struktur, die den Überkreuzungspunkt zwischen den beiden Doppelsträngen darstellt, durch „Branch Migration“ in Richtung 3'-Ende des eingedrungenen Stranges hin verschoben, so dass kein Austausch der beteiligten Stränge erfolgt, sondern lediglich Sequenzinformationen aus dem Donorduplex übernommen werden (Übersicht in Symington, 2005).

Hefe-Mutanten der Helikase SRS2 zeigen wie auch *sgs1*-Zellen erhöhte Raten somatischer Crossovers (COs), und beide Phänotypen lassen sich jeweils durch Überexpression des anderen Gens unterdrücken (Ira *et al.*, 2003). Eine Beteiligung in zwei unterschiedlichen Wegen der CO-Unterdrückung mit variabler Gewichtung ist also denkbar, wobei Ira *et al.* SRS2 im SDSA-Weg platzieren, während das RecQ-Homolog SGS1 eine spätere Funktion entsprechend dem nachfolgend in diesem Kapitel diskutierten DSBR-Modell zugesprochen wird (Ira *et al.*, 2003). Allerdings konnte auch für RecQ-Helikasen, am Beispiel des BLM-Proteins der Fruchtfliege, *in vitro* die Auflösung solcher für den SDSA-Weg charakteristischen D-Loops nachgewiesen werden (Bachrati *et al.*, 2006). Eine direkte Beteiligung von RecQ-Helikasen an diesem Weg wäre mit der Tatsache vereinbar, dass bisher biochemisch keine SRS2-Aktivität am entsprechenden Substrat gezeigt werden konnte und daher noch weitere Faktoren beteiligt sein sollten (Krejci *et al.*, 2003).

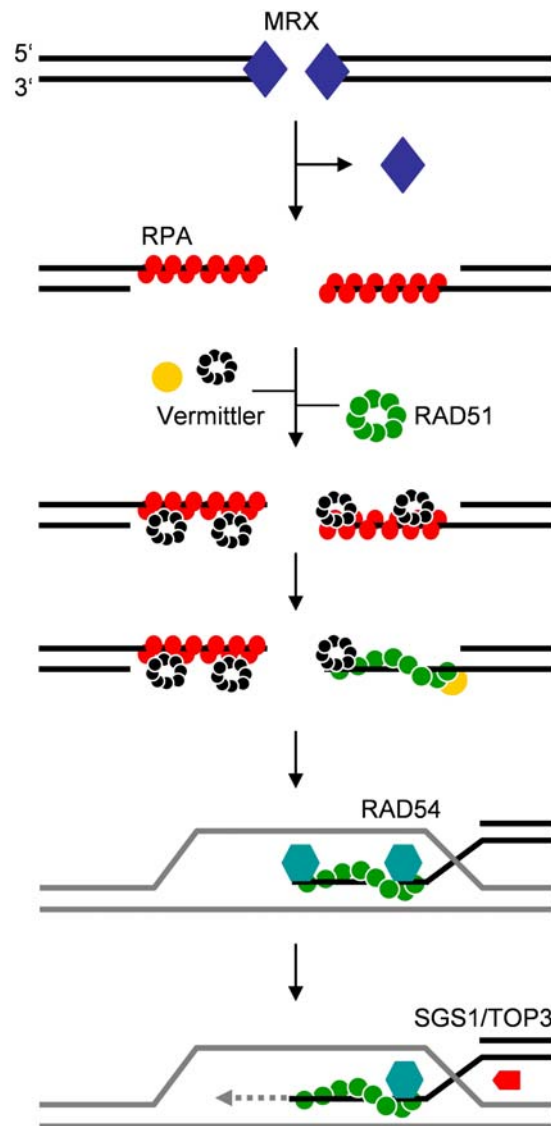


Abbildung 8: Initiation der HR ausgehend von einem DSB

Durch den MRX-Komplex werden die Enden zunächst prozessiert, so dass einzelsträngige 3'-Überhänge entstehen, an die sich RPA anlagert. Vermittelt durch RAD52 und den RAD55/57-Komplex bildet RAD51 unter Verdrängung von RPA ein Proteinfilament aus, das den Einzelstrang bedeckt. Dieser kann nun mit Hilfe von RAD54 in einen homologen Duplexbereich eindringen und diesen als Matrize für die DNA-Neusynthese nutzen. Dabei kann die Verzweigungsstelle (HJ) durch SGS1 und TOP3 in einem als Branch Migration bezeichneten Prozess verschoben werden. Weitere an dieser frühen Phase der HR beteiligte Proteine, werden im Text zusammengefasst (Übersicht in Symington, 2005).

Andererseits kann die Holliday-Struktur zu einer doppelten HJ (dHJ) umgesetzt werden. Dies geschieht entweder durch RAD52-vermittelte Invasion des zweiten Bruchendes in den gleichen Doppelstrang (Sugiyama *et al.*, 1998), oder aber indem der eingedrungene Strang ohne ein vollständiges Herauslösen aus dem Donor-Duplex auf der anderen Seite des Bruchs mit dem zweiten Ende ligiert wird. Letzterer Vorgang wird als „Second End Capture“ bezeichnet, für das ebenfalls eine Funktion des RAD51-Proteins diskutiert wird (Sugiyama *et al.*, 2006).

Die dHJ ist als zentrales Intermediat des Doppelstrangbruch-Reparatur-Modells anzusehen, dass ursprünglich von Szostak *et al.* anhand der Bäckerhefe entwickelt und seitdem mehrfach modifiziert wurde. Hier werden, wie in Abbildung 9 schematisch dargestellt, für die Auflösung der dHJ zwei parallel verlaufende Wege diskutiert (Szostak *et al.*, 1983; Thaler und Stahl, 1988; Übersicht in Cobb und Bjergbaek, 2006). Einerseits können mit Hilfe der RecQ-Helikase SGS1 und der Topoisomerase TOP3 durch „Branch Migration“ und Auflösung der dadurch entstandenen Katenan-Struktur Produkte ohne Crossover (NCO, non crossover products) entstehen. Dieser Vorgang wird in der Fachliteratur als „Dissolution“ bezeichnet und ist mit den hyperrekombinogenen Phänotypen diverser RecQ-Mutanten vereinbar. Andererseits können durch die sogenannte „Resolution“ abhängig vom genauen Mechanismus, nach dem an der dHJ geschnitten wird, sowohl COs als auch NCOs entstehen. Letzterer Zweig des DSBR-Modells involviert die strukturspezifische Endonuklease MUS81 und ihren Interaktionspartner MMS4, beide führen in der Bäckerhefe bei Mutationen in Kombination mit *sgs1* zu einer Letalität der Zellen (Mullen *et al.*, 2001; Kaliraman *et al.*, 2001; Übersicht in Cobb und Bjergbaek, 2006).

Die Abkürzung MUS81 steht für „MMS- und UV-sensitiv“, dieses Protein wurde zuerst bei Hefe und Mensch entdeckt. Während in Eubakterien noch kein MUS81-Homologon gefunden wurde, beschrieben Roberts und White bei Archaea eine Endonuklease, die sowohl MUS81 als auch dem eukaryotischen XPF-Protein ähnelt (Roberts und White, 2005). Von *Schizosaccharomyces pombe* weiß man, dass MUS81-Mutanten nur wenige überlebensfähige Sporen bilden, und sensitiv gegenüber MMS, UV-Strahlung und Hydroxyurea

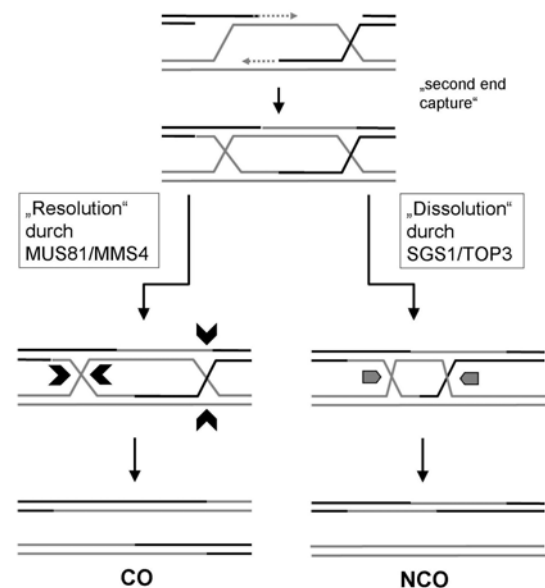


Abbildung 9: Zwei parallele Wege der Auflösung doppelter Holliday-Strukturen

In der HR entsteht nach Invasion des ersten Bruchendes, DNA-Synthese und die Verknüpfung mit dem zweiten Ende des DSBs („second end capture“) die dHJ. Diese kann einerseits durch den MUS81-Endonukleasekomplex aufgelöst werden, woraus je nach genauem Schnittmechanismus COs oder NCOs resultieren können (NCOs nicht gezeigt). Andererseits führt die Auflösung der dHJ durch SGS1 und TOP3 strikt zu NCO-Produkten (verändert nach Szostak *et al.*, 1983; Übersicht in Cobb und Bjergbaek, 2006).

sind (Boddy *et al.*, 2001). Zudem wurden Defekte in der Meiose festgestellt, während mitotische Genkonversionen unauffällig verlaufen (Übersicht in Haber und Heyer, 2001). Wie auch beim Menschen heißt der MUS81-Interaktionspartner der Spaltheife EME1 (essential meiotic endonuclease 1), deren Mutation in der Spaltheife einen mit *mus81* vergleichbaren Phänotyp verursacht (Boddy *et al.*, 2001).

Der MUS81-Komplex spaltet *in vitro* sowohl intakte HJs als auch solche, die schon einen Einzelstrangbruch im Zentrum aufweisen, zu linearen, doppelsträngigen DNA-Molekülen auf. Letztere werden als „Nicked Holliday Junctions“ bezeichnet und stellen bei rekombinanten MUS81-Komplexen die besser geeigneten Substrate dar. Ein von Gaillard *et al.* 2003 vorgeschlagener Mechanismus liefert eine mögliche Erklärung dieses Phänomens: Der Resolvase-Komplex wirkt in zwei Schritten. Der erste Schritt verläuft langsam und betrifft den ersten Schnitt auf einem Strang in der Nähe der Verzweigungsstelle einer intakten HJ. Ist dieser Schnitt gemacht, wird das Enzym sofort auf die der ersten Schnittstelle gegenüberliegende Seite dirigiert und induziert dort den zweiten Bruch. Die *in vitro* bestimmten Substratspezifitäten unterscheiden sich je nach Organismus, so schneiden z.B. die aus *S. pombe* oder dem Menschen isolierten nativen MUS81-Komplexe auch intakte HJ mit hoher Effizienz, wohingegen genickte HJ für die *in vitro* synthetisierten Komplexe aus *S. cerevisiae* die geeigneteren Substrate darstellen (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001).

Eine Besonderheit in *A. thaliana* ist, dass das EME1-Gen dupliziert vorliegt: EME1A besteht aus 546, EME1B aus 551 Aminosäuren. Die beiden Proteine sind zu 62,7% identisch und aus jeweils 12 kodierenden Exons aufgebaut (Geuting, 2008).

Während für die somatische DSB-Reparatur theoretisch alle drei beschriebenen Modelle, also SDSA, DSBR und der dem klassischen DSBR-Modell parallel gestellte, über RecQ-Helikasen verlaufende Weg denkbar sind (Übersicht in Cobb und Bjerbaek, 2006), ist die Frage nach ihrer jeweiligen Gewichtung und Vorkommen in meiotischer HR eher umstritten. Die Annahme, dass meiotische DSBs vor allem über DSBR repariert werden passt nicht zu dem Befund, dass in der Bäckerhefe die genaue Konfiguration der entstehenden NCOs oftmals mit den Vorhersagen der von MUS81 verursachten Schnittmuster unvereinbar ist (Gilbertson *et al.*, 1996; Merker *et al.*, 2003). Passenderweise ist MUS81 in der Bäckerhefe zwar für meiotische COs, nicht aber für NCOs erforderlich, was die Existenz eines alternativen Weges bestätigt (Smith *et al.*, 2003). Zudem wurde beobachtet, dass meiotische NCO-Produkte bereits zeitgleich mit den dHJs entstehen, weshalb von Allers und Lichten diskutiert wurde, dass der Großteil der meiotischen NCOs direkt über SDSA gebildet wird. Dementsprechend fiel die Entscheidung zwischen NCO und CO bereits vor der Ausbildung einer dHJ (Allers und Lichten, 2001; McMahill *et al.*, 2007). Allerdings wurde aber auch schon 1995 ein alternativer Mechanismus diskutiert, über den meiotische HR-Intermediate noch nach Ausbildung einer dHJ-Struktur nicht nur zum CO, sondern mit Hilfe einer Topoisomerase auch zum NCO-Produkt aufgelöst werden können (Schwacha und Kleckner, 1995).

1.2.4 Bisher bekannte Komponenten des RTR-Komplexes

Die Abkürzung RTR steht für „RECQ–TOP3 - RMI1“ und bezeichnet einen Komplex mit evolutionär stark konservierter Komposition (Übersicht in Mankouri und Hickson, 2007). Bereits 1994 wurde für SGS1 der Bäckerhefe eine Interaktion mit der Typ IA –Topoisomerase TOP3 nachgewiesen, die im Gegensatz zu den an der Replikation beteiligten Topoisomerasen 1 und 2 der Hefe noch wenig charakterisiert ist (Gangloff et al., 1994; Übersicht in Champoux, 2001 und Corbett und Berger, 2004; Weinstein und Rothstein, 2008). Dabei ist die Bezeichnung SGS1 (slow growth suppressor 1) direkt auf den Effekt zurückzuführen, dass eine *SGS1*-Mutation den Wachstums- und Rekombinationsphänotyp von *top3* unterdrückt. So wurde ihre gemeinsame Beteiligung an einem Rekombinationsweg vorhergesagt (Gangloff et al., 1994). Eine entsprechende Interaktion konnte inzwischen tatsächlich für einige RecQ-Helikasen verschiedener Organismen nachgewiesen werden; beispielsweise ist das menschliche BLM-Protein ebenso wie RECQ5B mit TOP3 α assoziiert (Johnson et al., 2000, Wu et al., 2000; Shimamoto et al., 2000), und auch die RecQ-Helikase RQH1 der Spaltheife mit dem entsprechenden Topoisomerase-Homolog (Laursen et al., 2003). Zusätzlich weisen genetische Ansätze auf eine vergleichbare Situation auch in anderen Organismen hin, wie in *E. coli*, *Caenorhabditis elegans* und *Xenopus laevis* (Harmon et al., 1999; Kim et al., 2002; Li et al., 2004). Aufgrund der mit einer Mutation von TOP3 bzw. TOP3 α oftmals assoziierten schwerwiegenden Phänotypen, wie Letalität in der Spaltheife, der Fruchtfliege und in Mäusen (Li und Wang, 1998; Maftahi et al., 1999; Plank et al., 2005), schreitet die weiterführende Charakterisierung der Funktionen des Proteins nur langsam voran. Da von Arabidopsis lebensfähige TOP3 α -Mutanten existieren, sind genetische Untersuchungen an Pflanzen als Modell für höhere Eukaryoten daher besonders spannend. Ein weiteres TOP3-Homolog höherer Eukaryoten ist TOP3 β . Phänotypen von Mutanten dieses Gens sind jedoch vergleichsweise mild, z.B. sind *top3 β* -Mäuse lebensfähig. Dabei weisen sie dennoch Fertilitätsdefekte und verkürzte Lebensspannen auf (Kwan et al., 2003; Kwan und Wang, 2001).

Erst vor drei Jahren wurde RMI1 (RecQ-mediated genome instability 1) als eine dritte Komponente des Komplexes identifiziert, wobei eine direkte Interaktion mit dem menschlichen BLM-Protein nachgewiesen werden konnte. Dabei ist RMI1 für die Stabilität des Komplexes *in vivo* essentiell und führt bei einer Mutation zu schlechterer Proliferation der untersuchten HeLa-Zellen. Analog zu den für *blm* beschriebenen Mutantenphänotypen ist auch in *rmi1* die Rate an SCE-Ereignissen signifikant erhöht. RMI1 wird beim Menschen auch als BLAP75 (BLM-associated protein 75) bezeichnet und verleiht dem RTR-Komplex seine alternative Benennung als BTB-Komplex (BLM-TOP3 α -BLAP75) (Yin et al., 2005). Mutanten des in der Bäckerhefe kodierten RMI1-Homologs weisen erhöhte Rekombinationsraten und mitotische Defekte auf, die analog zur genetischen TOP3/*SGS1*-Interaktion durch eine Mutation des RecQ-Gens *SGS1* unterdrückt werden können. Tatsächlich interagiert das RMI1-Protein hier sowohl mit SGS1 als auch mit TOP3 (Chang et al., 2005).

Trotz der in Mutanten beschriebenen gravierenden Phänotypen von *rmi1* konnte dem Protein bislang keinerlei katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Die einzige darin kodierte Proteindomäne, die bisher beschrieben wurde, ist eine sogenannte OB-Falte (oligonucleotide binding); so konnte, passend zu den für das menschliche BLM erhaltenen Ergebnissen, eine besonders effiziente Bindung des RMI1-Proteins aus der Hefe an Holliday-Strukturen und einzelsträngiger DNA gezeigt werden. Aufgrund der genetischen und biochemischen Daten wird also angenommen, dass die wesentliche Funktion von RMI1 darin besteht, die Stabilität des Komplexes zu gewährleisten und deren Bindung an die entsprechenden DNA-Substrate zu vermitteln oder begünstigen (Yin *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 2005).

Dass RMI1-Gene in so verschiedenen Organismen wie Mensch, Bäckerhefe und auch *C. elegans* identifiziert wurden, weist auf eine starke evolutionäre Konservierung des RTR-Komplexes in der Form hin, wie er für Mensch und Hefe bereits näher charakterisiert wurde (Yin *et al.*, 2005).

1.2.5 Beteiligung des RTR-Komplexes an den verschiedenen DSB-Reparaturwegen

Mutanten von Komponenten des RTR-Komplexes weisen typischerweise Defekte in der Reparatur bestimmter DNA-Schadentypen, sowie erhöhte Raten illegitimer Rekombination auf (vergl. Kapitel 1.1.2 und 1.2.4). Zudem konnte für *RMI1* in der Hefe ein mit *SGS1* identisches Spektrum synthetisch letaler Interaktionen nachgewiesen werden; beide Mutationen sind jeweils letal in Kombination mit den HR-Mutationen *mus81*, *mms4* und *slx1*. Eine gemeinsame Funktion von RMI1 und SGS1 in einem Komplex, dessen Funktion den genannten Faktoren parallel geschaltet ist, ist daher naheliegend. Dass dieser Weg ebenfalls die Auflösung von HR-Intermediaten betreffen muss wird dadurch gezeigt, dass sich diese Letalitäten durch Mutation früher HR-Faktoren wie RAD51 und RAD54 aufheben lassen (Mullen *et al.*, 2005; Fabre *et al.*, 2002). Dementsprechend ist der RTR-Komplex bei der Reparatur somatischer Doppelstrangbrüche in den bereits erläuterten Weg einzuordnen, über den parallel zur endonukleolytischen Spaltung einer dHJ-Struktur eine Auflösung stattfindet, deren Resultate reine NCO-Produkte sind. Dabei katalysiert die jeweilige RecQ-Helikase unter ATP-Verbrauch die Verschiebung der HJ, wodurch sich eine sogenannte Katenan-Struktur ausbildet. Im nächsten Schritt findet deren Auflösung mit Hilfe der beteiligten Typ IA –Topoisomerase statt, die dafür mit Hilfe von RMI1 an das DNA-Substrat rekrutiert wird (Übersicht in Cobb und Bjergbaek, 2006). Wie in Abschnitt 1.2.1 zusammengefasst, kann eine solche Form der Rekombination neben klassischen Doppelstrangbrüchen auch DNA-Schäden betreffen, die z.B. die Replikation blockieren, oder ausgelöst durch genotoxische Agenzien oder Strahlung in einem Einzel- oder Doppelstrangbruch resultieren. Im Gegensatz zu diesem in der HR als „Dissolution“ bezeichneten Prozess müssen andere, für einzelne RecQ-Helikasen beschriebene Funktionen, nicht notwendigerweise auch die

Komplexpertner TOP3/TOP3 α und RMI1 erfordern. Dazu geh6ren beispielsweise die Checkpoint-Aktivierung und Initiation der Rekombination durch RECQ aus *E. coli*, oder die m6glichlicherweise in den SDSA-Weg einzuordnende Aufl6sung von D-Loops unter anderem durch RECQ als auch das menschliche BLM-, WRN- und RECQ1-Protein (Harmon und Kowalczykowski, 1998; van Brabant *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005; 6bersicht in Sharma *et al.*, 2006).

Ob diese „Dissolution“, die mit Hilfe des RTR-Komplexes abl6uft, in der Meiose ebenfalls stattfindet, ist strittig; dennoch weisen diverse RecQ-Mutanten meiotische Defekte auf, wenn auch diese nicht zwangsl6ufig einen vergleichbaren Prozess betreffen m6ssen. Jedenfalls widerspricht einer Beteiligung der RecQ-Helikasen am meiotischen SDSA-Weg der erst k6rzlich in Hefe beschriebene Befund, dass die durch Invasion des ersten Bruchendes in den homologen Duplex entstandenen D-Loops, sogenannte „Single-End-Invasion-Intermediate“ (SEIs), in SGS1-Mutanten nicht statistisch signifikant erh6ht sind. Aufgrund der in der Mutante erh6hten Zahl von Verkn6pfungen zwischen drei bis vier unabh6ngigen Duplexbereichen geht man eher davon aus, dass SGS1 deren Bildung unterdr6ckt und stattdessen eine Funktion bei der Ausbildung korrekter, interhomologer dHJs besitzt. Daf6r spricht die Tatsache, dass die Mutanten vermehrt nah beieinander liegende meiotische COs produzieren, deren Bildung durch die Verkn6pfung mehrerer Doppelstr6nge beg6nstigt wird (Oh *et al.*, 2008).

Alternativ w6re eine Beteiligung des RTR-Komplexes bei der Aufl6sung bereits gebildeter dHJs denkbar, wie er von Schwacha und Kleckner vorgeschlagen wurde (Schwacha und Kleckner, 1995). Tats6chlich ist eine Mutation des f6r die Typ IA –Topoisomerase TOP3 kodierenden Gens mit Sterilit6t und damit mit einer essentiellen meiotischen Funktion des Proteins verbunden (Gangloff *et al.*, 1994; Gangloff *et al.*, 1999). Auch Mutanten der RecQ-Helikase SGS1 zeigen in der Hefe reduzierte Sporulation in Verbindung mit schlechter Lebensf6higkeit der Sporen, was mit der beobachteten Missegregation der Chromosomen in der Meiose in Zusammenhang gestellt wurde (Watt *et al.*, 1995 und 1996). F6r das menschliche BLM wurde sogar schon 2000 neben somatischen Zellen auch in solchen, die eine meiotische Teilung durchlaufen, eine Interaktion mit TOP3 α festgestellt (Johnson *et al.*, 2000). Dementsprechend ist eine gemeinsame Funktion beider Komponenten in einem potenziellen RTR-Komplex, wie f6r die Aufl6sung somatischer HR-Intermediate gezeigt, auch im Zuge der meiotischen Teilung m6glich, auch wenn sie noch nie direkt bewiesen wurde.

Dass RecQ-Helikasen generell Funktionen in der meiotischen Rekombination wahrnehmen k6nnen, spiegelt sich in den Ph6notypen der Mutanten wieder, die wie *sgs1*, *blm* und *wrn* Fertilit6tsdefekte aufweisen. Dennoch stellt sich die Frage, inwieweit sich die verschiedenen Homologe im Laufe der Evolution auf bestimmte Rollen spezialisiert und funktionell voneinander distanziert haben. Erst k6rzlich wurde eine f6rdernde Funktion in der meiotischen Rekombination f6r RQH1, eine von zwei RecQ-Helikasen der Spalthefe entdeckt; das steht z.B. in v6llichem Gegensatz zur dem f6r SGS1 beschriebenen Effekt, nahe beieinander liegende CO-Produkte zu verhindern (Cromie *et al.*, 2008). Die Frage nach der evolution6ren Differenzierung ist aber vor allem dann besonders spannend, wenn

sich innerhalb eines Organismus mehrere RecQ-Gene etabliert haben, so wie es in höheren Eukaryoten generell der Fall ist.

1.2.6 Potenzielle Komponenten des RTR-Komplexes in *Arabidopsis thaliana*

Bei der Suche nach den RecQ-Genen, die in dem in dieser Arbeit untersuchten Modellorganismus am wahrscheinlichsten einem potenziellen RTR-Komplex zuzuordnen sind, bietet sich zunächst der Vergleich mit besser charakterisierten Homologen an.

Bezüglich der Sequenzen existieren in *Arabidopsis thaliana* zwei Gene, die als *BLM*-Homologe anzusehen sind, *RECQ4A* und *4B* (At1g10930 und At1g60930). Innerhalb ihrer konservierten Domänen besteht bei beiden Proteinen eine Sequenzidentität von etwa 53% im Vergleich mit dem *BLM*-Protein, und etwa 46% mit *SGS1* aus der Bäckerhefe. Untereinander besitzen *RECQ4A* und *4B* sogar etwa 70% Identität bezüglich ihrer Aminosäure und Nukleotidsequenzen. Diese Gene entstanden durch ein Duplikationsereignis, das heutzutage auf Chromosom 1 liegt und einen Bereich von etwa 35 kb betrifft. In diesem Bereich wurden acht Gene vorausgesagt, von denen 4 der so entstandenen Genpaare mit dem *RECQ4A/4B*-Paar vergleichbare Ähnlichkeiten untereinander aufweisen (Hartung *et al.*, 2000; Hartung und Puchta, 2004). Zwischen *RECQ4A* und *4B* ist aber auch die Ähnlichkeit außerhalb der konservierten Motive überraschend hoch und betrifft beispielsweise auch eine Konservierung aller 25 Intronpositionen. Dabei sind diese beiden Gene die einzigen unter den *RECQ*-Homologen von *Arabidopsis*, die für ein konserviertes Intron in ihrem 5'-UTR-Bereich kodieren. *RECQ4A* und *4B* sind mit einer Länge von 1188 und 1150 aa deutlich größer als die anderen *RecQ*-Proteine in *A. thaliana*, die nur aus maximal 858 aa bestehen (Hartung *et al.*, 2000). Unter allen Pflanzen die bisher bezüglich dieser Duplikation untersucht wurden, kann das Genpaar nur in Brassicaceen gefunden werden, nicht aber z.B. im Reis oder der Pappel. Dementsprechend ist das Duplikationsereignis in der Evolution einem Zeitraum zuzuordnen, der während der Entwicklung der dikotyledonen Pflanzen nach Abspaltung der Pappel, aber vor Entstehung der Brassicaceen (vor ca. 30 Millionen Jahren) stattgefunden hat (Hartung und Puchta, 2006).

Für *recq4A* wurde in *A. thaliana* 2004 der *RecQ*-typische Hyperrekombinations-Phänotyp beschrieben, sowie erhöhte Sensitivitäten der Mutanten gegenüber UV-Strahlung und MMS. Zudem kann die Expression des intakten Gens als einziges unter den *RecQ*-Homologen von *Arabidopsis* in der Hefemutante *sgs1* sowohl deren erhöhte somatische HR als auch deren MMS-Sensitivität unterdrücken (Bagherieh-Najjar, 2004). Die Vermutung liegt also nahe, dass das entsprechende Protein in einen konservierten RTR-Komplex involviert ist, der in *Arabidopsis* somatische HR unterdrückt und an der Reparatur bestimmter DNA-Schäden beteiligt ist. Im Zuge zweier Diplomarbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte einerseits der Phänotyp von *recq4A* bestätigt

werden, andererseits weisen beide Studien darauf hin, dass *RECQ4B* als die zweite Komponente des duplizierten Genpaares erstaunlicherweise nicht diese RecQ-typischen Funktionen teilt. Allerdings hatte hier bisher nur eine einzelne *recq4B*-Linie zur Verfügung gestanden, weshalb sich zu Beginn dieser Arbeit die Aufgabe der genauen und statistisch signifikanten Charakterisierung der Funktionen von *RECQ4B* stellte (Bergmann, 2004; Suer, 2005).

Besonders faszinierend ist in diesem Zusammenhang, inwiefern in komplexen Organismen wie Arabidopsis im Laufe der Evolution eine funktionelle Differenzierung zwischen mehreren Homologen stattgefunden hat. RECQ aus *E. coli* werden sowohl pro- als auch anti-rekombinogene Funktionen zugesprochen, und die Überexpression des einzigen *RECQ4*-Gens im Reis führt zu erhöhter HR (Li und Li, 2004). Von großem Interesse ist daher die Frage, ob eine solche Funktion auch direkt von einer oder mehreren der RecQ-Helikasen in Arabidopsis vertreten wird, und ob diese ebenfalls mit einem potenziellen RTR-Komplex im Zusammenhang steht.

Gemeinsam mit RecQ-Helikasen sind, wie bereits beschrieben, Topoisomerasen des Typs IA bei der Unterdrückung illegitimer somatischer Rekombination in den RTR-Komplex involviert. In *A. thaliana* gibt es wie auch in anderen höheren Eukaryoten zwei *TOP3*-Homologe, *TOP3 α* und *TOP3 β* (At5g63920 und At2g32000) (Hanai *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000), von denen für letzteres bisher kein Mutantenphänotyp detektiert werden konnte (Hartung, persönliche Mitteilung).

Eine erste *TOP3 α* -Mutante, *top3 α -1*, zeigt schwerwiegende somatische Defekte, die sich in deformierten Kotyledonen, der fehlenden Ausbildung von Wurzeln und einer Degeneration der Keimlinge innerhalb weniger Wochen äußert (Hartung *et al.*, 2007).

Im Rahmen der Dissertation von Rebecca Wurz-Wildersinn wurde hingegen *top3 α -2* als eine mildere Mutante meiotisch untersucht. Diese ist zwar im Gegensatz zu *top3 α -1* lebensfähig, weist aber dennoch ernsthafte meiotische und mitotische Defekte auf (Wurz-Wildersinn, 2007). Die Aufklärung der Funktion von *TOP3 α* in einem potenziellen RTR-Komplex von *A. thaliana* ist deshalb Teil der hier vorliegenden Arbeit.

Bisher identifizierte *RMI1*-Proteine sind untereinander in ihrer Sequenz nur schwach konserviert, weshalb auch in Pflanzen lange kein entsprechender Kandidat gefunden wurde. Im Genom von *A. thaliana* sind zwei Gene kodiert, At5g63540 und At5g19950, die auf Proteinebene dem menschlichen *RMI1* nur zu 15,5 und 14,6 Prozent homolog sind, und auch untereinander nur eine Homologie von 13,7 Prozent aufweisen. Da für At5g19950 zwar Mutanten erhältlich sind, diese aber keinerlei Hinweise auf meiotische Defekte oder Sensitivitäten gegenüber genotoxischen Agenzien geben, wurde dieses Gen in der vorliegenden Arbeit nicht weiter charakterisiert. Hingegen ist eine Mutation des ersten potenziellen *RMI1*-Gens (At5g63540) mit reduzierter Fertilität verbunden. Deshalb wurde es im Rahmen dieser Arbeit als *RMI1* bezeichnet und weiter charakterisiert. Inzwischen wurde die cDNA

dieses Gens hergestellt und sequenziert, wodurch Auskunft über ein Protein von 644 aa Länge erhalten wurde (Hartung *et al*, 2008, im Reviewprozess).

In der Bäckerhefe sind Mutationen der RTR-Gene in Kombination mit z.B. *mus81*, *mms4*, oder *slx1* letal, ein Effekt der sich durch Mutationen in frühen HR-Genen beheben lässt (vergl. Kapitel 1.2.5). Daraus wird geschlossen, dass sie jeweils an zwei alternativen Wegen der Auflösung von Intermediaten der homologen Rekombination beteiligt sind. Im Genom von *A. thaliana* ist ebenfalls ein *MUS81*-Homolog kodiert, das wie in der dieser Arbeit vorausgehenden Diplomarbeit beschrieben wurde, tatsächlich Funktionen in der somatischen DNA-Reparatur besitzt. Dementsprechend stellt sich die Frage nach dem Effekt doppelter Mutationen, also von *MUS81* und zusätzlich von möglichen Komponenten eines konservierten RTR-Komplexes in *A. thaliana*.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Die Gene der RecQ-Helikasen erfüllen bedeutende Aufgaben bei der Erhaltung der Genomintegrität und sind zwischen den verschiedensten Organismen hochkonserviert. Beim Menschen führen Mutationen dieser Gene zu schweren Krankheiten, die alle mit einer hohen Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Krebs assoziiert sind. Erklärt wird dies durch die Funktion der RecQ-Helikasen, gemeinsam mit der Topoisomerase 3 bzw. 3α und dem DNA-Bindeprotein RMI1 bzw. BLAP75, übermäßige Rekombination zu unterdrücken. Dieser konservierte Komplex wird als RTR bzw. BTB bezeichnet, und arbeitet in einem Weg der Auflösung somatischer HR-Intermediate, wie sie in der homologen Reparatur von DNA-Brüchen oder an stehengebliebenen Replikationsgabeln entstehen. Aus den durch den RTR-Komplex katalysierten Schritten resultieren ausschließlich NCO-Produkte, während in einem alternativen Weg durch endonukleolytische Spaltung, in Abhängigkeit vom genauen Mechanismus, sowohl COs als auch NCOs entstehen können.

Für einige RecQ-Homologe verschiedener Organismen konnte außerdem gezeigt werden, dass sie Funktionen in der meiotischen Rekombination besitzen, auch wenn die genauen Mechanismen hier weitgehend unbekannt sind.

Im Genom des hier untersuchten Modellorganismus *A. thaliana* werden insgesamt sieben RecQ-Gene kodiert, wobei sich die Frage nach der evolutionären funktionellen Differenzierung aufdrängt. Welche Funktionen wurden also möglicherweise von einem gemeinsamen Vorgänger auf mehrere Homologe verteilt oder inwieweit fand ein Zugewinn neuer Funktionen statt? Unter dem evolutionären Aspekt betrachtet sind in *A. thaliana* besonders *RECQ4A* und *4B* interessant, die als Partner eines durch Duplikation entstandenen Genpaares beide bezüglich ihrer Sequenz als Homologe des menschlichen *BLM* sowie von *SGS1* der Bäckerhefe anzusehen sind.

Ziel dieser Arbeit war es, *RECQ4A* und *4B* funktionell in den Kontext der DNA-Reparatur und Rekombination einzuordnen. Dabei galt es einerseits, zwischen beiden Helikasen bezüglich ihrer Rolle in der Reparatur bestimmter Schadenstypen zu unterscheiden, und zu definieren, in wieweit sie mit der konservierten RecQ-Funktion, übermäßige Rekombination zu unterdrücken, vereinbar sind. Wichtig war in diesem Zusammenhang ebenso, *MUS81* als mögliche Komponente eines alternativen Rekombinationsweges in *Arabidopsis* zu untersuchen; sowohl anhand von *MUS81*-Einzelmutanten als auch durch Kreuzung mit Mutanten der RecQ-Gene. Andererseits stellte sich die Frage nach möglichen Interaktionspartnern der RecQ-Helikasen *RECQ4A* und *4B*, weshalb in diesem Zusammenhang auch Mutanten von *TOP3 α* und *RMI1* untersucht und mit den Phänotypen der RecQ-Mutanten verglichen wurden. Nicht zuletzt war der spannenden Frage nachzugehen, ob ein möglicherweise in *A. thaliana* konservierter RTR-Komplex neben der somatischen auch in die meiotische HR involviert ist, und falls ja, ob dies notwendigerweise eine identische Zusammensetzung des Komplexes erfordert.

2 MATERIAL UND METHODEN

Standardchemikalien wie Ethanol, Methanol, Isopropanol, Aceton, Phenol, Essigsäure, KOH, Saccharose und EDTA werden von ortsüblichen Herstellern bezogen.

2.1 Sterile Pflanzenkultur

Geräte

Reinraumbank (Luft- u. Reinraumtechnik GmbH, Typ HF BDK)
Reinraumbank (Luft- u. Reinraumtechnik GmbH, Typ KVF BDK)
Zentrifuge (Eppendorf, mini Spin)
Vortexer (Janke & Kunkel IKA Labortechnik, VF2)
Inkubationsschrank (Percival Scientific, CU-36L4)
Binokular (Zeiss, Stemi DV4)
Heizschränke groß und klein (Memmert)

2.1.1 Sterilisieren von Arabidopsis-Saatgut

Ethanol, unvergällt, 70 %
Natriumhypochloridlösung, 12 % (NaOCl, Carl Roth GmbH)

Sämtliche Schritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Samen werden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 0,5 ml 70 % Ethanol versetzt und vermischt. Nach etwa 1 min wird der Ethanol abgenommen, und die Samen mit sterilem H₂O bidest. gewaschen. Während der achtminütigen Einwirkzeit von je 0,5 ml 4 % NaOCl-Lösung (hergestellt aus 12 %) werden die Reaktionsgefäße immer wieder gut geschüttelt. Anschließend werden die Samen abzentrifugiert (15 sec, 6000 rpm) und dreimal mit sterilem H₂O bidest. gewaschen. Aufgrund der zur Keimung erforderlichen Stratifikation erfolgt die Lagerung der am Ende wieder in sterilem H₂O bidest. aufgenommenen Samen bei 4 °C im Kühlschrank, mindestens über Nacht, bis hin zu maximal einer Woche.

2.1.2 Sterile Anzucht von Arabidopsis-Keimlingen

Murashige & Skoog-Medium (Duchefa Biochemie)
Plant Agar (Duchefa Biochemie)
Saccharose, KOH

Cefotaxim-Natrium (Duchefa Biochemie)
Gentamycin-Sulfat (Duchefa Biochemie)

Die sterilisierten Samen werden an der Reinraumbank jeweils einzeln mit einer Pipettenspitze auf das in den entsprechenden Versuchen erwünschte Festmedium übertragen. Die Standard-Anzucht erfolgt auf GM-Medium (4,9 g/l Murashige & Skoog Fertigmedium, 10 g/l Saccharose, 7,5 g/l Plant Agar, pH 5,7 (KOH)). Für Segregationsanalysen und die Selektion positiv transformierter Nachkommen werden entsprechende Antibiotika wie in Tabelle 1 angegeben vor dem Giessen der Platten zugefügt. Keinen Agar enthaltendes, flüssiges GM-Medium findet andererseits Verwendung in Versuchen, in denen Mutagene eingesetzt werden, oder in Rekombinations-Tests zur Bestimmung von HR-Raten in Mutantenlinien. Im Inkubationsschrank werden die Pflanzen täglich bei 22 °C 16 Stunden lang belichtet, gefolgt von einer Dunkelphase von acht Stunden bei 20 °C.

Tabelle 1: Eingesetzte Antibiotika für die Selektion transgener Pflanzen

Antibiotikum	Konzentration	Verwendung
Cefotaxim	500 mg/l	Zur Selektion transformierter Pflanzen, wirkt gegen <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Gentamycin	60 mg/l	Selektion von Pflanzen, die erfolgreich mit dem pPZP221-Vektorsystem transformiert wurden

2.1.3 Mutagen-Behandlung

GM-Medium (siehe 2.1.2)
Camptothecin (Sigma-Aldrich)
Cisplatin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Methylmethansulfonat, MMS (Sigma-Aldrich)
Mitomycin C (MMC, Serva Electrophoresis)

Am Vortag sterilisierte Samen (siehe 2.1.1) werden zu 100 bis 120 pro Petrischale auf festem GM-Medium ausgesät. Nach einer Woche Anzucht im Percival Inkubationsschrank werden die Pflanzen zu je 10 pro Vertiefung in 6-Well-Plates umgesetzt, die jeweils 5 ml flüssiges GM-Medium für die unbehandelten Kontrollen, und je 4 ml für die Mutagen-Proben enthalten. In je einem Milliliter GM-Medium werden am nächsten Tag die Mutagene zu hinzugegeben, so dass die gewünschten Endkonzentrationen erreicht werden, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Für die Untersuchung der sterilen Mutantenlinie *top3 α -2* wird der Sensitivitätsassay angepasst und das Saatgut heterozygoter Pflanzen verwendet: Das Umsetzen der Pflanzen, die nur zu 40-50 pro Petrischale angezogen werden, erfolgt erst nach zwei Wochen. So wird beim Umsetzen ein Sortieren der *top3 α -2* Pflanzen ermöglicht, die zu diesem Zeitpunkt schon einen charakteristischen Wuchsphänotyp, erkennbar durch nicht glattrandige oder teilweise eingerollte Blätter, aufweisen. Der

Zusammenhang zwischen Genotyp und Wuchs konnte durch PCR bestätigt werden. Zum Vergleich werden der Wildtyp, *recq4A-1* sowie die teilsterile homozygote Mutante *rml-2* mitgetestet. Die Vorbereitung der Platten und die Zugabe der Mutagene erfolgen nach dem oben beschriebenen Prinzip. Von allen Linien werden pro Vertiefung der 6-Well-Plates aber nur 5 Pflanzen umgesetzt und die in Tabelle 3 zusammengefassten Konzentrationen untersucht. Alle beschriebenen Schritte werden an der Reinraumbank durchgeführt. Für die Auswertung werden die Pflanzen 13 Tage nach Mutagenzugabe mit Küchenpapier abgetupft und das Frischgewicht mit Hilfe einer Feinwaage bestimmt. Die ermittelten Werte werden schließlich in Prozent der jeweiligen unbehandelten Kontrolle ausgedrückt, um linienspezifische Abweichungen im Wachstum auszuschließen, die in keinem Zusammenhang mit den durch die eingesetzten Substanzen induzierten Schäden stehen.

Tabelle 2: Konzentrationen der in Sensitivitätstests eingesetzten Mutagene

Mutagen	Konzentrationen					Untersuchte Mutanten
Cis-Platin	5	10			µM	<i>recq4A-1,2; recq4B-1,2; recq4A-1/4B-1</i>
MMC	5	10	15	20	µg/ml	<i>mus81-1,2</i>
MMS	40	60	80	100	ppm	<i>recq4A-1,2; recq4B-1,2; recq4A-1/4B-1</i>
MMS	20	40	60	100	ppm	<i>mus81-1,2</i>

Tabelle 3: Mutagenbehandlung steriler Mutanten und entsprechender Kontrollen

Mutagen	Konzentrationen					Untersuchte Mutanten
MMC	5	10	15	20	µg/ml	<i>top3α-2; rml-2; rq4A-1</i>
Cis-Platin	5	10			µM	<i>top3α-2; rml-2; rq4A-1</i>
MMS	40	60	80	100	ppm	<i>top3α-2; rml-2; rq4A-1</i>

2.1.4 Rekombinationsassay

GM-Medium (siehe 2.1.2)
 Bleomycinsulfat (Duchefa Biochemie)
 Natriumazid (Merck)
 Cyclohexyl-Ammonium (X-GlcA, Duchefa Biochemie)
 Dimethylformamid (Roth)
 100 mM Phosphatpuffer
 Ethanol, vergällt, 70%

Bei den verschiedenen Mutanten soll die Rate der homologen Rekombination mit und ohne Stressinduktion verglichen werden. Dazu werden die IC9C-Linien, die das unterbrochene GUS-Gen enthalten, jeweils mit Bleomycin behandelt und einige Tage später mit dem farblosen X-GlcA versetzt, woraufhin unter dem Binokular die Rekombinationsereignisse in Form von blauen Sektoren gezählt werden können. Der Nachweis beruht auf einem homozygot in die Pflanzen integrierten Konstrukt, das zwei überlappende Teile eines unterbrochenen β -Glucuronidasegens enthält. Tritt

innerhalb des Homologiebereichs ein Doppelstrangbruch (DSB) auf, führt dieser nur bei Reparatur über interchromosomale Rekombination zu einer nachweisbaren Restauration des Reportergens (Molinier *et. al.*, 2004). Die im Hintergrund der *MUS81*-Mutationen zusätzlich untersuchten 651-Linien entsprechen dem gleichen Prinzip, allerdings wird hier sowohl intra- als auch intermolekulare HR erfasst.

Die Samen werden wie unter 2.1.1 beschrieben sterilisiert und herangezogen. Nach einer Woche Anzucht im Percival Inkubationsschrank werden die Pflanzen zu je 50 (651-Linien je 30) Stück in geteilte Petrischalen mit je 10 ml flüssigem GM-Medium pro Seite übertragen, die Bleomycin-Ansätze enthalten zunächst nur 9 ml. Die Zugabe des Bleomycins erfolgt am nächsten Tag, gelöst in dem jeweils fehlenden Milliliter GM-Medium pro Ansatz. Dabei wird eine Endkonzentration von 5 µg/ml erreicht.

Modifiziert wird auch dieser Versuch für die Charakterisierung der sterilen Mutantenlinien, in diesem Fall *top3α-2*, *rmi1-1* und entsprechende Doppelmutanten mit *recq4A-1*. Hier wird für die Aussaat zunächst das Saatgut heterozygoter Pflanzen verwendet. Indem die Keimlinge weniger dicht ausgesät und erst nach zwei Wochen zu je 20 Stück umgesetzt werden, können *top3α-2* und *recq4A-1/top3α-2* wie auch in 2.1.3 beschrieben nach ihrem

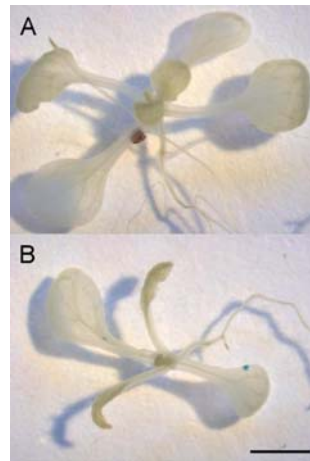


Abbildung 10: IC9C-Pflanzen nach dem Entfärben in 70 % vergälltem Ethanol

Im Gegensatz zur Kontrolle (A) entwickelt *top3α-2* (B) im Anschluss an die Kotyledonen deutlich fehlgebildete Blätter mit gezackten, oft eingewinkelten Rändern. So wird ein Sortieren der Pflanzen schon beim Umsetzen in das Flüssigmedium ermöglicht. Balken = 2 mm.

Phänotyp sortiert und jeweils homozygot für den Assay verwendet werden. Im Falle der *rmi1*-Linien, die in ihrem Wachstum unauffällig erscheinen, steht auf diese Weise genug Pflanzenmaterial pro Keimling zur Verfügung, um nach Abschluss des Versuchs eine Genotypisierung durch PCR zu ermöglichen. Um auch hier pro Ansatz und Mutante eine Zahl von etwa 20 homozygoten Keimlingen in die Auswertung einbeziehen zu können, werden jeweils vier Proben parallel angesetzt.

Als Kontrolle dient eine homozygote IC9C-Linie, die der Kreuzung *recq4A/IC9C* entstammt (bzw. eine 651-Kontrolle aus der *recq4B/651*-Kreuzung) und nach Aufspaltung in der F1-Generation nach Mendel bezüglich der RecQ-Mutation wieder dem Wildtyp entspricht.

1 ml 1% Na-Azid-Lösung (in H₂O bidest.) und 2,5 ml 1 % X-GlcA-Stammlösung (in Dimethylformamid) werden mit 46,5 ml 100 mM Phosphatpuffer vermischt. Die Pflanzen werden sechs Tage (bzw. fünf Tage im Falle der 651-Linien) nach Zugabe des Bleomycins mit je 5 ml dieser Färbelösung versetzt und drei Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Pflanzen mindestens eine Stunde lang (maximal über Nacht) in 70 % vergälltem Ethanol bei 55-60 °C entfärbt um die Blattfarbstoffe auszuwaschen, und bis zum Auszählen der Punkte unter dem Binokular in dieser

Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die blauen Sektoren pro Pflanze werden für jeden Ansatz einzeln gezählt und am Ende gemittelt.

2.2 Anzucht und Versuche im Gewächshaus

Geräte

Elektroporationsgerät (BioRad, Gene Pulser II)
Inkubationsschrank (Genlab Ltd., Widnes, England)
Schüttler (B. Braun Biotech International, Certomat IS)
Photometer (Pharmacia Biotech, Ultrospec 1000)
Zentrifuge (Hermle, Z383K)
Magnetrührer (Roth, Magnetic Stirrer R1000)
Sehhilfen für Pflanzenbestäubung (Binokular/Stirn-Lupe)

2.2.1 Anzuchtbedingungen

Floraton 3 (Floragard)
Vermiculit (2-3 mm, Deutsche Vermiculite, Dämmstoff GmbH)

Alle Pflanzen, die für die Saatgutproduktion, für Kreuzungen, Blütenuntersuchungen, oder die Untersuchung von Wachstum und Schotenertrag Verwendung finden, werden im Gewächshaus angezogen. Dabei dient als Substrat ein Gemisch aus Floraton 3 und Vermiculit verwendet, in einem Verhältnis von 1:1. Täglich werden die Pflanzen für 14 Stunden belichtet, gefolgt von 10 Stunden nächtlicher Dunkelheit.

2.2.2 Kreuzungen

Von den Mutterpflanzen werden zunächst mit einer feinen Schere Schoten, sowie Blütenknospen, die nicht mehr vollständig geschlossen sind, abgeschnitten. Mit Hilfe einer spitzen Pinzette werden nun auch die an den Blütenständen innen liegenden, noch sehr kleinen Knospen entfernt, und anschließend jeweils die Fruchtknoten der drei bis vier Knospen geeigneter Größe freipräpariert. Für die Bestäubung werden der Vaterpflanze bereits geöffnete Blüten entnommen, und ihre Antheren vorsichtig über die Fruchtknoten der Mutterpflanze gestrichen. Mit Hilfe von Binokular oder Lupe kann dabei das tatsächliche Vorhandensein von Pollenkörnern auf der Narbe kontrolliert, und dadurch der Erfolg der Bestäubung erheblich verbessert werden.

2.2.3 Transformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*

Kompetente Zellen von *Agrobacterium tumefaciens*, Stamm AGL1
Vektoren pPZP221-*RMII* und -*TOP3 α*
Plant Agar (Duchefa Biochemie)
Pepton (Duchefa Biochemie)
Saccharose, KOH
Fleischextrakt (GERBU)
Hefeextrakt (Duchefa Biochemie)
Mg-Sulfat (Merck)
Spectinomycin-Dihydrochlorid (Duchefa Biochemie)
Rifampicin (Duchefa Biochemie)
Murashige & Skoog Medium (Duchefa Biochemie)
6-Benzylaminopurin (Duchefa Biochemie)
Acetosyringon (Roth)
Silwet L-77 (OSi Specialities, Inc., Danbury, CT, USA)

In einer Elektroporations-Küvette werden 100 μ l elektrokompenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm AGL1) mit 5 μ l der entsprechenden Plasmid-Lösung (20-50 ng) vermischt. Für die hier durchgeführten Komplementationen wird der Vektor pPZP221 eingesetzt, der neben einer Resistenz gegenüber Gentamycin die genomische Sequenz von *TOP3 α* bzw. *RMII* trägt, in Verbindung mit dem natürlichen Promotor und Terminator des jeweiligen Gens. Die Klonierung wurde jeweils über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *SalI* (vor dem Promotorbereich) und *SacI* (hinter dem natürlichen Terminator) im Rahmen der Diplom- und Doktorarbeit von Alexander Knoll durchgeführt (Knoll, unveröffentlichte Daten).

Nach Anleitung des Herstellers findet die Elektroporation nun mit Hilfe des BioRad Gene Pulser II statt. Die Bakterien werden anschließend auf YEB-Medium ausplattiert, das die gewünschten Selektionsantibiotika enthält (8 g/l Agar, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose, 5 g/l Fleischextrakt, 1 g/l Hefeextrakt, 0.49 g/l Mg-Sulfat, 0.1 g/l Spectinomycin, 0.1 g/l Rifampicin), und einige Tage bis zum Erscheinen von Kolonien bei 28 °C inkubiert. Eine leicht modifizierte Variante des Protokolls, das von Clough und Bent 1998 entwickelt wurde (Clough und Bent, 1998), dient zur Transformation der Arabidopsis-Pflanzen. Hierfür wird zunächst eine beide Selektionsantibiotika (0,1 g/l Spectinomycin und 0,1 g/l Rifampicin) enthaltende 50-ml-Vorkultur in YEB-Medium vorbereitet und mit Hilfe einer Einzelkolonie angeimpft. Nach Inkubation dieser Kultur über Nacht (28 °C, 200 rpm) werden daraus 500 μ l in eine entsprechende 400 ml-Hauptkultur übertragen, die für die Selektion nur noch Spectinomycin enthält.

Am nächsten Tag werden die Zellen, sobald sie etwa eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 1,7 erreicht haben, für 15 min bei 20 °C und 4500 rpm abzentrifugiert. Direkt im Anschluss erfolgt das Resuspendieren in frisch hergestelltem Infiltrationsmedium (40 g Saccharose, 2 g Murashige & Skoog Medium, 3.4 μ l Benzyladenosin (1 mg/ml), 800 ml H₂O bidest., pH 5.7 (KOH)), das direkt vor Gebrauch zusätzlich mit 800 μ l Acetosyringon (100 mg/ml) und 400 μ l Silwet versetzt wird.

Unter leichtem Rühren werden die Pflanzen, von denen zuvor geöffnete Blüten und bereits entstandene Schoten entfernt wurden, einzeln für jeweils 30 Sekunden bis zu den Rosettenblättern in die Bakteriensuspension getaucht. Die Lagerung der Pflanzen erfolgt bis zum nächsten Morgen liegend in zugedeckten, mit feuchtem Küchenpapier ausgelegten Schalen. Durch Spülen mit Wasser werden schließlich Rückstände von Bakterien und Infiltrationsmedium entfernt und die Pflanzen aufgestellt. Das Saatgut wird geerntet, sobald sich zahlenmäßig etwa das erste Viertel der Schoten gelb verfärbt hat, da später reifende Schoten auf Blütenknospen zurückgehen, die sich erst nach der Transformation gebildet haben.

2.2.4 Schotenuntersuchungen

┆ Ethanol, vergällt, 70 %

Aus der Mitte der ausgewachsenen Arabidopsis-Pflanze werden beliebige Triebe geschnitten, an denen die Schoten bereits leicht gelblich verfärbt sind. Dabei werden pro Pflanzenlinie und Untersuchung je fünf Pflanzen, je Pflanze wiederum zehn Schoten untersucht.

Über Nacht erfolgt das Ausbleichen der Schoten im Kühlschrank, in 70 % vergälltem Ethanol. Schließlich werden mit Hilfe eines Binokulars die Samen pro Schote gezählt und Mittelwerte pro Pflanze berechnet.

2.3 Blütenuntersuchungen

┆ Heizschränke (Memmert)
┆ Fluoreszenzbinokular (Olympus, SZX-ILLB2-200)
┆ Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axio Imager M1), DIC-Ausstattung
┆ Lichtmikroskop (Olympus, OKX41), Kamera-Adapter

2.3.1 Alexanderfärbung von Pollen

┆ Ethanol, unvergällt, 96 %
┆ Malachitgrün-Oxalat (Merck)
┆ Fuchsinäure (Sigma Aldrich)
┆ Orange G (Sigma Aldrich)
┆ Phenol, Glycerin
┆ Chloralhydrat (Sigma Aldrich)
┆ Essigsäure, konzentriert

Die Alexanderfärbung (Alexander 1969; Bonhomme et al., EMBO Course, Module 1) dient zur Überprüfung der reifen Pollenkörner bezüglich ihrer Lebensfähigkeit. Hierfür werden Blüten geerntet und einige bis zur Präparation in 10 % Ethanol bei 4 °C gelagert. In einem Tropfen der Alexanderlösung (10 ml Ethanol (95 %), 1 ml Malachitgrün (1 % in Ethanol), 5 ml Fuchsin (1 % in dest. Wasser), 0,5 ml Orange G (1 % in Wasser), 5 g Phenol, 5 g Chloralhydrat, 2 ml Eisessig, 25 ml Glycerin, 50 ml dest. Wasser) werden die Antheren reifer, 1-2 mm großer Blütenknospen auf einem Objektträger freigelegt und die Präparate mit einem Deckglas versehen. Nach einer viertelstündigen Inkubation erfolgt die Dokumentation mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

2.3.2 Fluorescein-Diacetat-Färbung von Blütenpollen

Aceton, Saccharose
Fluorescein-Diacetat (Sigma Aldrich)

Durch die Fluorescein-Diacetat-Färbung soll die Integrität der Plasmamembran von Pollen, und damit ihre Lebensfähigkeit überprüft werden. Dafür werden 2 mg des Feststoffs in 1 ml Aceton gelöst und diese Lösung im Anschluss Tropfen für Tropfen zu 10 ml einer 0,5 M Saccharose-Lösung hinzu pipettiert, bis die Flüssigkeit milchig trübt wird.

In einem Tropfen dieser Suspension werden nun die Antheren freipräpariert und durch Auflegen eines Deckglases das Herausquetschen der Pollenkörner ermöglicht. Nach fünfminütiger Inkubation werden die Präparate bei Beleuchtung der Wellenlänge 350-400 nm mit geeignetem Filtersatz analysiert und dokumentiert.

2.3.3 DAPI-Färbung von Meiose- und Mitosestadien in der Pollenentwicklung

Methanol
Essigsäure, konzentriert und 45%ig
Zitronensäure (Roth)
Natriumcitrat (Merck)
Zellulase und Pektinase (Sigma Aldrich)
Einbettungsmedium mit 15 µg/ml DAPI (Verctashield)

Das in einem Gemisch aus Methanol und Essigsäure (3:1) fixierte Pflanzenmaterial wird vor der Präparation mit Citratpuffer gewaschen, hergestellt aus 4 ml 0.1 M Zitronensäure, 6 ml 0.1 M Natriumcitrat und 90 ml destilliertem Wasser. Bei 37 °C werden die Blüten anschließend in einer Dampfkammer für 30 min in Citratpuffer inkubiert, der zusätzlich jeweils 2 % Zellulase und Pektinase enthält. Nach zwei fünfminütigen Waschschrritten in Citratpuffer werden auf Superfrost Objektträgern

(Roth) in einem Tropfen 45 %iger Essigsäure die Antheren der Blütenknospen freipräpariert, die eine Größe von etwa 0,5 mm nicht überschreiten (vergl. Abbildung 11). Ein Deckglas wird aufgelegt und die Pollenkörner durch leichten Druck aus den Antheren gedrückt. Ein zügiges Entfernen des Deckglases mit Hilfe einer Rasierklinge wird durch schockgefrieren des Präparats in flüssigem Stickstoff für 30 sec ermöglicht. Die luftgetrockneten Präparate werden schließlich mit je 15 µl Vectashield-Einbettungsmedium versetzt, das den Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthält (Bleuyard und White, 2004), und mit frischen Deckgläsern versehen. Zur Analyse der Meiose- und Mitosestadien diverser Mutantenlinien findet ein Fluoreszenzmikroskop mit geeignetem DAPI-Filterblock Verwendung.

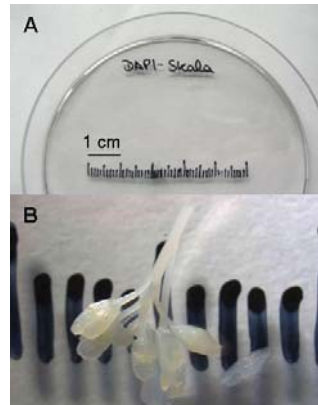


Abbildung 11: Auswahl geeigneter Blüten für die DAPI-Färbung

Mit Hilfe einer Millimeterskala (A) lassen sich Knospen geeigneter Größe identifizieren. Meiosestadien während der Pollenentwicklung sind vor allem in knapp 0,5 mm großen Blütenknospen zu erwarten.

2.3.4 DIC-Mikroskopie zur Untersuchung des weiblichen Gametophyten

Formalin, 37 % (Applichem)
 Essigsäure, konzentriert
 Ethanol, unvergällt, 96 %
 Aceton
 Ethylbenzoat (Fluka)
 Spurr's Resin

Die Fixierung der Blüten erfolgt in FAA, das 3,7 % Formalin, 5 % Essigsäure und 30 % Ethanol enthält. In dieser Lösung werden die Blüten über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wird das Pflanzenmaterial mit Hilfe einer Acetonreihe dehydriert, in aufsteigenden Konzentrationen zwischen 50 und 100 % Aceton. Für zwei Stunden erfolgt anschließend die Entfärbung in Ethylbenzoat, bevor sie zur Lagerung in ein 7:1 –Gemisch von Ethylbenzoat und Spurr's Resin (Spurr, 1969) überführt werden. Die Lagerung kann bis hin zu einigen Wochen bei -20 °C, oder über Nacht bei 4 °C erfolgen. Von Interesse für die Analyse der Entwicklungsstadien des weiblichen Gametophyten sind vor allem jeweils die drei oder vier kleinsten Knospen eines Blütenstandes, die bereits gelbe Antheren enthalten. In einem Tropfen des Ethylbenzoat-Spurr-Gemischs werden jeweils die Fruchtknoten aus den Knospen heraus präpariert und durch einen vorsichtigen Längsschnitt geöffnet. So werden die Samenanlagen freigelegt und können mit der feinen Pinzette aus dem

Fruchtknoten herausgelöst werden. Ein Deckglas wird aufgelegt, und die Analyse erfolgt innerhalb weniger Tage mit Hilfe eines Mikroskops, das mit der DIC (Differential Interference Contrast) Technologie ausgestattet ist.

2.4 Nukleinsäure-Präparationen

Geräte

Zentrifuge mit 24er-Rotor (Hermle Labortechnik)
Thermomixer (Eppendorf, compact)
Photometer (Pharmacia Biotech, Ultrospec 1000)

2.4.1 Kleine „Shorty“- DNA-Präparation für Genotypisierung

Tris/HCl (Promega)
LiCl (Roth)
EDTA, Isopropanol
SDS (Serva)

DNA aus Blattstücken wird in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäßen durch Zermörsern mit Hilfe kleiner Kunststoffpistille und Versetzen mit je 500 µl Shorty-Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl, 400 mM LiCl, 25 mM EDTA, 1 % SDS, pH 9) in Lösung gebracht. Die Proben werden vorsichtig geschüttelt. Fünf Minuten lang werden bei 12000 rpm feste Pflanzenbestandteile abzentrifugiert, und anschließend 350 µl des Überstandes zur Fällung der DNA in vorbereitete 1,5 ml-Gefäße überführt, die jeweils 350 µl Isopropanol enthalten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 min bei 14000 rpm wird der Überstand verworfen und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Eluierung erfolgt schließlich in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8), durch Schütteln bei 37 °C für 15 min.

Modifiziert wird dieses Protokoll für die im HR-Assay bereits entfärbten Keimlinge der sterilen Mutantenlinien. Hier werden die Pflänzchen als Ganze zermörsert und die festen Bestandteile aufgrund der feineren Beschaffenheit schon im ersten Schritt für 10 anstelle von 5 Minuten abzentrifugiert. Um eine für die PCR-Analyse ausreichende DNA-Ausbeute zu erhalten, werden zur Eluierung nur 200 µl TE-Puffer je Ansatz verwendet.

2.4.2 RNA-Isolierung

RNA-Präparationskit (Qiagen, RNeasy Plant Mini Kit 50)

Die Isolierung von RNA für die Charakterisierung der *rmi1*-Mutationen wird mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kit (50) von Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Jeweils 100 mg Pflanzenmaterial wird hierfür eingesetzt, wobei verschiedene Gewebetypen, wie Blätter, Blüten oder Schoten eingesetzt werden können.

2.4.3 Umschreiben von RNA in cDNA für Expressionsanalysen

“RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas)

Für die Expressionsanalyse wird zunächst mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits von Qiagen (siehe 2.4.2) RNA aus Blüten, Blattmaterial, Schoten sowie aus gemischtem Material dieser Gewebetypen gewonnen. Es folgt die photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen anhand der optischen Dichte bei 260 nm, wobei ein Wert von 0,1 in der 1:50 verdünnten Probe linear in eine Konzentration von 0,2 µg/µl der entsprechenden Originalprobe umgerechnet wird. Ein 5 µg RNA enthaltendes Probenvolumen wird mit 1 µl Oligo-dT-Primer vermischt, mit H₂O bidest. auf 12,5 µl aufgefüllt, und dieser Ansatz für 5 min im Heizblock auf 70 °C erhitzt. Nach einer schnellen Abkühlung auf Eis werden zu jedem Ansatz 4 µl fünffach konzentrierter Puffer, sowie 2 µl dNTPs hinzugegeben, sowie 0,5 µl des RNase-Inhibitors. Für 5 min erfolgt eine Inkubation bei 37 °C, bevor 1 µl der Reversen Transkriptase zugefügt wird. Bei 42 °C wird nun für 60 min die RNA umgeschrieben und die Reaktion im Anschluss für 10 min bei 72 °C abgestoppt. Die Ansätze werden wiederum auf Eis gestellt und auf jeweils 100 µl Gesamtvolumen mit H₂O bidest. aufgefüllt.

2.5 PCR-Methoden

Geräte

Thermocycler (Biometra, Tpersonal)
Thermocycler (Eppendorf, Mastercycler gradient)
Gelkammern (BIOplastics BV, Com Phor L Maxi und Midi)
Gelkammer (Bio-Rad, Wide Mini Sub Cell GT)
Netzgerät (Biozym)
Netzgeräte (Bio-Rad, Power Pac 300 oder Basic)

Software | „Meg Align“ (Lasergene DNASTar 5.03)

2.5.1 Mutanten-Genotypisierung

10x Puffer für Taq-Polymerase (Biomaster)
Nukleotidtriphosphate (dNTPs) G-A-T-C, 100 mM (Fermentas)
Oligonukleotide siehe Tabelle 4 (50 pM, Metabion)
Taq-Polymerase (Biomaster)
Agarose (SeaKem, Lonza)
Tris (Promega)
Essigsäure, konzentriert
EDTA, Glycerin
Ethidiumbromid, 1 % (Roth)
Orange G (Sigma Aldrich) und Xylene Cyanol FF (Serva)
DNA-Größenmarker „Gene Ruler 1 kb DNA Ladder“ (Fermentas)

Die einfache Genotypisierung von Kreuzungsnachkommen und sterilen, durch die Verwendung heterozygoten Saatguts segregierenden Mutanten wird mit Hilfe der Taq-Polymerase von Biomaster, oder durch eine ähnlich effiziente, direkt im Institut in *Escherichia coli* exprimierte Taq-Polymerase durchgeführt. Als Puffer eignet sich in beiden Fällen der von Biomaster mitgelieferte, zehnfach konzentrierte Taq-Puffer ebenso wie ein selbst hergestelltes Äquivalent.

Prinzipiell werden alle T-DNA-Insertionsmutanten durch zwei verschiedene Tests genotypisiert: Zunächst erfolgt der Positivnachweis auf Vorhandensein der inserierten T-DNA am entsprechenden Genlocus. Hierzu dient jeweils ein genspezifischer Primer, und einer, der in der gewünschten Orientierung innerhalb der inserierten Sequenz bindet. Um heterozygote von homozygoten Mutanten unterscheiden zu können, wird zudem mit Hilfe zweier genspezifischer Primer, die vor und hinter der potenziellen Insertion binden, eine Unterbrechung des zu amplifizierenden Fragments durch die T-DNA nachgewiesen. In diesem Test ergeben Wildtyp-Pflanzen und heterozygote Individuen eine entsprechende PCR-Bande. In Homozygoten hingegen ist in beiden Kopien des entsprechenden Gens der Abstand der Primer-Bindestellen durch die zwischen ihnen liegende Insertion stark vergrößert. Hier wird nicht ausreichend Zeit gewährt, um diese längere PCR-Bande zu bilden.

Je PCR-Ansatz werden 41 µl destilliertes Wasser, 5 µl des zehnfach konzentrierten Polymerase-Puffers, 1 µl dNTPs (10 mM Stammlösung), je 0,5 µl der beiden Oligonukleotide, 0,15 µl Biomaster-Taq-Polymerase (5 U/µl; ersatzweise etwa 0,2 µl der selbst hergestellten Polymerase, wobei dieser Wert je nach Charge individuell angepasst wird) und 2 µl der jeweiligen Shorty-DNA-Präparation eingesetzt. Die Amplifikationszeit beträgt bei beiden o.g. Taq-Polymerasen etwa 30 bis 60 Sekunden pro 1000 Basenpaare.

Im Falle der *rmi1-1* Mutante ist ein etwa 2 kb großer Teil des Gens deletiert. Hier erfolgt der Positivnachweis alternativ zum Nachweis der Bordersequenzen der T-DNA mit Hilfe zweier vor und hinter der Deletion bindender Oligonukleotide, genannt RMI1_In1_Fw und RMI1_In2_rev. Durch die Verkürzung des RMI1-Gens in der Mutante erhält man in homozygoten und heterozygoten Mutanten eine charakteristische Deletionsbande von etwa 600 bp, während der Abstand der Bindestellen in der Wildtyp-Sequenz etwa 2,6 kb beträgt.

Im Nachweis auf das Vorhandensein des intakten, dem Wildtypallel entsprechenden *RMI1*, wird der Forward-Primer in Kombination mit dem sogenannten RMI1_IN1_rev verwendet. Da letzterer im Bereich der potenziellen Deletion bindet, wird auch hier, vergleichbar mit den echten T-DNA-Insertionsmutanten, in Homozygoten kein PCR-Signal erzeugt. Die genaue Charakterisierung der *RMI1*-Allele der untersuchten Mutanten wird in 2.5.2 beschrieben.

Durch die PCR erhaltene DNA-Fragmente werden im elektrischen Feld in 0,9 % Agarosegelen (0,9 % Agarose in 1xTAE-Puffer (aus Stammlösung 50x, enthält 242 g/l Tris, 57,1 ml Eisessig 0,5 M EDTA, pH 8), 3,75 µl je 100 ml Ethidiumbromid (1%)) aufgetrennt und anschließend in einer UV-Kammer fotografiert. Dafür werden zuvor jeweils 10 µl der Proben zuvor mit 2 µl des sechsfach konzentrierten Ladepuffers (0,2 % Orange G, 0,05 % Xylene Cyanol, 10 % Glycerin, 60 nM EDTA) versetzt.

Tabelle 4: Für die Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien verwendete Oligonukleotide

Die mit einem Stern gekennzeichneten Primer werden zusätzlich für den Positivnachweis auf die jeweilige Insertion eingesetzt, gemeinsam mit einem entsprechenden in der Grenzsequenz der T-DNA bindenden Oligonukleotid.

Zielsequenz oder Mutante	Primer-bezeichnung	Sequenz
T-DNA SALK T-DNA GABI	Tair LBd1 Gabi LB1	TCG GAA CCA CCA TCA AAC AG GAC CAT CAT ACT CAT TGC TG
<i>recq4A-1</i> <i>recq4A-1</i> <i>recq4A-1</i>	RQ4A(-2A) RQ4A-R6 RQ4A(-2B)*	GTC CTG ATC GTG TTG GAC AG GAA TAA GAG ACA CAA GTG GAG CTT TGC TGT TAA AGT TGG CTC
<i>recq4B-1</i> <i>recq4B-1</i>	RQ4B-2A RQ4B-R1BA*	TGC TAC AAT GAG TGG TTG TG TGT GGT ACG CTC ACA ATA TG
<i>top3α-1</i> <i>top3α-1</i>	T3A-3A* T3A R2B	TGT GAT GGG ATA TGA TGA CAT G TTC CTG AGT GCC ATA TCT G
<i>top3α-2</i> <i>top3α-2</i>	T3A-3 T3A R3A*	GGT GGA GGA ACA AAC AAG AC GAA AAC CGT GTA TTA GCA TC
<i>rmi1-1</i> <i>rmi1-1</i> <i>rmi1-1</i>	RMI1_In1_fw RMI1_In1_rev RMI1_In2_rev	AAC CGG AAA CCT CAG TAT C AAC AAA CGG ACC AGC GAG AGA AGC TCA TAC GTA GAC TG
<i>rmi1-2</i> <i>rmi1-1, -2</i>	RMI1_In2_fw RMI1_In2_rev*	TTC ACC ATA GCC GAG TTA C AGA AGC TCA TAC GTA GAC TG
<i>mus81-1</i> <i>mus81-1</i>	MUS81-1* MUS?-R2	AGT GAA TCT GAT AGT GAG TG GCA GCA TCA ATA AGC TCT TG
<i>rad51C-1</i> <i>rad51C-1</i>	RAD51C 0527* Rad51C 0528	TTT TGT GAC TAA ACA AAG GAG C ACC TCC ACT TAA GCT AGT CAA GG
IC9C IC9C	IC9C fw* IC9C rev	ACT GAG TTT GGT AAC CTG TG CCA GAA GTA AAA GTG AAG TTC

2.5.2 Insertionsorts-Charakterisierung

Oligonukleotide und PCR-Zubehör siehe 2.5.1
Agarosegele siehe 2.5.1
Aufreinigungs-kit für PCR-Produkte (Roche Diagnostics)

Zur genauen Bestimmung der T-DNA-Insertionsorte beider *rmi1*-Mutanten werden zunächst die aus der Datenbank des Herstellers (<http://signal.salk.edu/cgi/bin/tdnaexpress>) erhältlichen Sequenzinformationen zu den einzelnen Linien, in diesem Fall SALK_093589 und SALK_094387, heruntergeladen. Diese werden mit Hilfe des Computer-Programms „MegAlign“ (Lasergene DNASTar 5.03) mit der genomischen Sequenz des *RMII*-Gens verglichen (<http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At5g63540>). Ausgehend von dieser ersten Information werden die Insertionsorte durch PCR-Amplifikation der spezifischen Bereiche aus genomische DNA der Mutanten und anschließende Sequenzierung der PCR-Banden überprüft. Für die Amplifikation werden die in Tabelle 4 für *RMII* angegebenen Oligonukleotide eingesetzt, dabei wird die Taq-Polymerase von Biomaster mit entsprechendem Puffer eingesetzt. Das auf einem Agarosegel auf Reinheit und Länge geprüfte PCR-Fragment wird mit Hilfe des High Pure PCR Purification Kits nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt (Roche Diagnostics).

Durch den *in silico* Vergleich der aus der Sequenzierung (Auftrag an die Firma GATC Biotech, nach den Vorgaben des Anbieters) der PCR-Banden enthaltenen Daten mit der genomischen *RMII*-Sequenz werden schließlich basengenau die Orte an denen die T-DNA-Integrationen im Gen stattgefunden haben, sowie mögliche Deletionen von Sequenzabschnitten, ermittelt.

2.5.3 Expressionsanalyse

Oligonukleotide (siehe Tabelle 5), 50 pM (Metabion)

Für die Expressionsanalyse wird zunächst mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits von Qiagen (siehe 2.4.2) RNA aus Blüten gewonnen und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.4.3). Im Vergleich mit cDNA der Mutanten *rmi1-1* und *rmi1-2* soll gleichzeitig cDNA des Wildtyps, sowie dessen genomische DNA untersucht werden. Zusätzlich werden anhand einer sogenannten Wasserkontrolle, der keine Nucleinsäuren zugefügt werden, falsch positive Ergebnisse in Form von unspezifischen PCR-Banden ausgeschlossen. Die Kombinationen der Oligonukleotide sind in Tabelle 5 aufgeführt, und werden so gewählt, dass die Expression von *RMII* in den Mutanten sowohl vor als auch hinter der jeweiligen Mutation überprüft wird. Zudem wird durch die Primerkombination von *RMII_ATG_fw* mit *RMII_In2_rev* analysiert, inwiefern noch Expression über die Deletion oder die inserierte T-DNA hinweg stattfindet.

Tabelle 5: Oligonukleotide für die Analyse der *RMI1*-Expression in *rmi1-1* und *rmi1-2*

Die jeweils angegebenen Nachweise werden von cDNA der Mutantenlinien angestellt, und dabei sowohl mit Wildtyp-cDNA als auch mit genomischer DNA von Columbia verglichen.

Zielsequenz	Primerkombination	Primersequenz 5'-3'
1) Vor beiden Mutationen		
	RMI1 ATG fw	TGC GTA GAC GGC GCC TG
	RMI1 ATG rev	TCC GAC GGA TAA ACC GGA
2) Über die Deletion/Insertion hinweg		
	RMI1 ATG fw	TGC GTA GAC GGC GCC TG
	RMI1 In2 rev	GTT GTA ATC TGT CAA CCA AC
3) Hinter beiden Mutationen		
	RMI1_nIF3	CTG GAG TGA AGA AAT TCC AG
	RMI1_nIR2	GTC AGC GAG AAA CAA CTG

2.6 Organismen

2.6.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *A. thaliana* mit den für die Komplementationen der *rmi1* und *top3 α* -Linien einzusetzenden Konstrukten erfolgt mit dem *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm AGL1. (Lazo *et al.*, 1991; Chabaud *et al.*, 2003). Dieser Stamm besitzt Resistenzen gegenüber Carbenicillin und Rifampicin. Auf dem hier vorliegenden Ti-Plasmid (pTiBo542T- Δ DNA) sind Gene zur Verwertung des Opins Succinamopin kodiert, aber keine weiteren Resistenzgene.

2.6.2 Arabidopsis-Linien

Für die hier beschriebenen, mit Arabidopsis-Pflanzen durchgeführten Versuche wurden Wildtyp-Pflanzen des Ökotyps Columbia (Col-0), sowie entsprechende T-DNA-Insertionsmutanten eingesetzt, die in Tabelle 6 zusammengefasst sind (Alonso *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003).

Neben Kreuzungen von hier aufgeführten Einzelmutanten untereinander wurden vor und während der vorliegenden Arbeit auch diverse Kreuzungen im Hintergrund des IC9C-Assaykonstrukts durchgeführt.

Tabelle 6: T-DNA-Insertionslinien von *A. thaliana*

Es sind jeweils Quelle, Genlocus und die Position der Insertion im Gen bezüglich der Gesamtzahl an Exons oder Introns angegeben. "LB" bedeutet, dass die "left border" in Richtung des Startcodons liegt, "RB-LB" dass die Insertion andersherum orientiert ist. Mit "LB-LB" gekennzeichnete Insertionen sind Doppelinsertionen mit jeweils außen liegender "left border"-Sequenz. In *top3 α -2* ist die T-DNA auf einer Seite verkürzt. Die Linien stammen jeweils aus der SALK-T-DNA Collection (Alonso *et al.*, 2003) oder aus dem GABI-Katalog (Rosso *et al.*, 2003). Die Insertionsorte der genannten Linien wurden weitgehend vom Institut für Botanik 2, Universität Karlsruhe charakterisiert (Hartung, unveröffentlichte Daten; # Hartung *et al.*, 2006; * Hartung *et al.*, 2007). Die *rad51C*-Linie wurde beschrieben durch Abe *et al.*, 2005. Die hier als *recq4A-1* aufgeführte Mutante entspricht der in Hartung *et al.* 2007 charakterisierten *recq4A-4*.

Linie	Quelle	Genlocus	T-DNA	Insertion
<i>recq4A-1*</i>	GABI_203C07	At1g10930	LB-LB -40 nt	Exon 7(26)
<i>recq4A-2</i>	SALK_069672		LB-LB	Exon 4(26)
<i>recq4B-1</i> (urspr. 3) *	GABI_399C04	At1g60930	LB-LB	Exon 10(26)
<i>recq4B-2</i> (urspr. 1) *	SALK_011357		LB-LB -103 nt	Intron 10(26)
<i>mus81-1</i> #	GABI_113F11	At4g30870	LB-LB -22 nt	Intron 1(14)
<i>mus81-2</i> #	SALK_107515		RB-LB -11 nt	Intron 7(14)
<i>rmi1-1</i>	SALK_093589	At5g63540	deletiert, -1995 nt	Exon 1-5(8)
<i>rmi1-2</i>	SALK_094387		LB-LB	Exon 5(8)
<i>top3α-1*</i>	SALK_139357	At5g63920	LB-verk.	Intron 15(23)
<i>top3α-2</i>	GABI_476A12		RB-LB	Intron 11(23)
<i>rad51C-1</i>	SALK_021960	At2g45280	LB-LB, -52nt	Exon 3(9)

3 ERGEBNISSE

3.1 RECQ4A und 4B als potenzielle RTR-Komponenten

Die beiden Teile eines durch Duplikation entstandenen Genpaares, *RECQ4A* und *4B*, ähneln sich stark in ihrer Genstruktur und sind beide bezüglich ihrer Größe und Sequenz als Homologe des menschlichen *BLM* und des *SGS1* der Bäckerhefe anzusehen. Deshalb sollten sie hinsichtlich ihrer Rollen in der DNA-Schadensreparatur, -Rekombination und Mitwirkung an einem möglicherweise in Arabidopsis vorhandenen RTR-Komplex untersucht werden.

3.1.1 Sensitivitäten der Mutanten gegenüber genotoxischem Stress

3.1.1.1 MMS-Behandlung

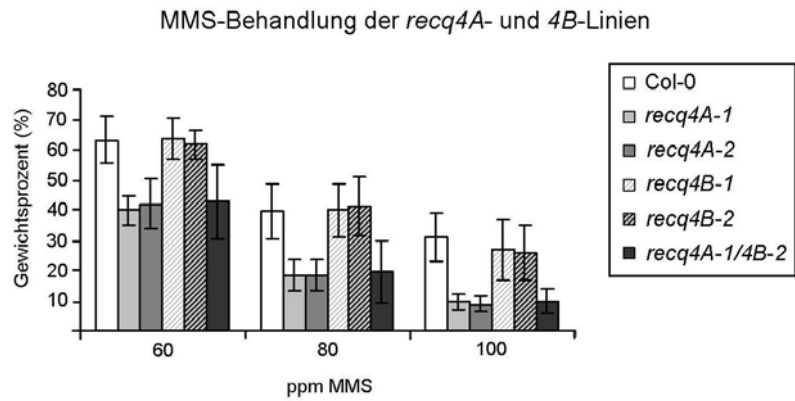
Trotz der starken Homologie zwischen beiden Genen konnte in dieser Arbeit, durch Behandlung der Pflanzen mit unterschiedlichen genotoxischen Agenzien, ein bedeutender funktioneller Unterschied zwischen *RECQ4A* und *4B* in der Reparatur von DNA-Schäden gezeigt werden.

Methylmethansulfonat verursacht DNA-Alkylierungen an verschiedenen Stellen der Nukleotide, wodurch als Produkte vor allem 7-Methylguanin und 3-Methyladenin entstehen, die falls sie nicht über Excisionsreparatur beseitigt werden, zu Fehlpaarungen führen oder eine Blockierung der Replikation verursachen können (Knippers, 2001; Tercero und Diffley, 2001). Dass *RECQ4A* eine Rolle bei der Reparatur solcher Schäden spielt, wurden bereits 2004 von einer holländischen Arbeitsgruppe publiziert (Bagherieh-Najjar, 2004), und etwa zur gleichen Zeit durch zwei dieser Arbeit vorausgehende Diplomarbeiten bestätigt. Dabei zeigten nach Hinweisen aus der Diplomarbeit von Tina Bergmann zwei weitere unabhängige *recq4A*-Linien deutliche Sensitivitäten gegenüber MMS (Bergmann, 2004; Suer, 2005).

Hier wurden diese Linien schließlich mit zwei T-DNA-Insertionslinien von *RECQ4B* verglichen; beide zeigen unter MMS-Einfluss interessanterweise keinerlei Wachstumsunterschiede zum Wildtyp. Eine Doppelmutante *recq4A-1/recq4B-2* ist in ihrem Verhalten mit der *recq4A-1*-Einzelmutante vergleichbar, wodurch der alleinige Effekt einer *RECQ4A*-Mutation auf die Reparatur von MMS-induzierten Schäden bestätigt wird, während eine Mutation von *RECQ4B* hierauf keinen Einfluss hat (siehe Abbildung 12; Hartung *et. al.*, 2007).

Abbildung 12: MMS-behandelte Mutanten von *RECQ4A* und *4B*

Im Gegensatz zu *recq4A* zeigen beide getesteten *recq4B*-Linien keinerlei Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Eine Doppelmutante *recq4A-1/4B-2* ist in ihrem Wachstum unter Einfluss von MMS mit den *recq4A*-Einzelmutanten vergleichbar. Dargestellt sind die Frischgewichte, angegeben in Prozent der unbehandelten Kontrolle jeder Linie.

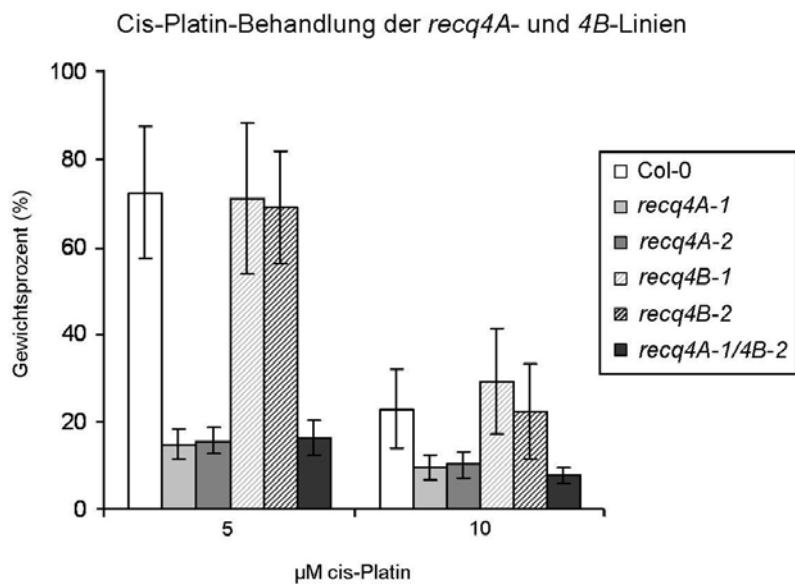


3.1.1.2 Cis-Platin-Behandlung

Analog zu der gezeigten Funktion des *RECQ4A*-Proteins in der Reparatur von MMS-induzierten DNA-Schäden, reagieren auch bei cis-Platin-Behandlung beide untersuchten *recq4A*-Linien, sowie die Doppelmutante *recq4A-1/recq4B-2* sensibler als der Wildtyp Col-0 (siehe Abbildung 13 und 14). Dies deutet auf eine Beteiligung von *RECQ4A* an der Reparatur dieser spezifischen Schäden hin, in die *RECQ4B* trotz der starken Homologie zu erstgenanntem Protein interessanterweise nicht involviert ist. Cis-Platin verursacht hauptsächlich DNA-Schäden in Form von kreuzverknüpften Guanin-Molekülen innerhalb eines Stranges, was eine Erkennung durch NER oder die „Mismatch“-Reparatur aktiviert, oder aber beim Zusammentreffen mit der Replikations-Maschinerie zu ihrer Blockierung führen kann.

Abbildung 13: Cis-Platin-behandelte Mutanten von *RECQ4A* und *4B*

Im Gegensatz zu *recq4A* zeigen beide getesteten *recq4B*-Linien analog zu den für MMS erhaltenen Daten keinerlei Sensitivität. Die Reaktion der Doppelmutante *recq4A-1/4B-2* entspricht bei Wachstum unter Einfluss des Crosslinkers der von *recq4A-1* und -2. Dargestellt sind die Frischgewichte, angegeben in Prozent der unbehandelten Kontrolle jeder Linie.



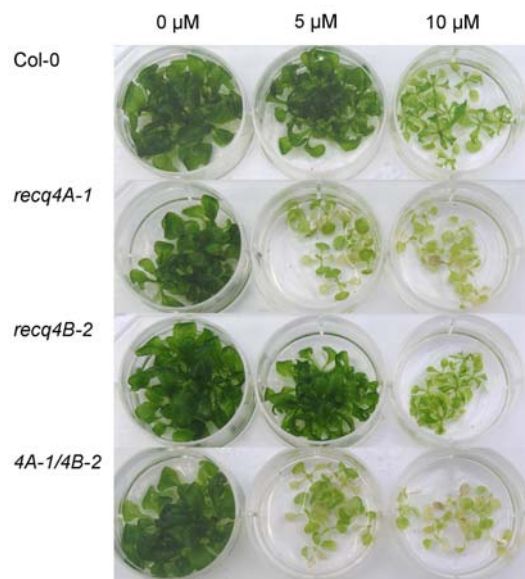


Abbildung 14: *Recq4A*- und *4B*-Pflanzen nach cis-Platin-Behandlung

Die hier gezeigten Pflanzen wurden nach einer Woche von GM-Festmedium in entsprechendes Flüssigmedium umgesetzt. Nach 13-tägiger Behandlung mit cis-Platin zeigen *recq4A-1* und die Doppelmutante deutliche Sensitivität gegenüber dem Mutagen im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Die Mutation von *RECQ4B* allein löst diesen Effekt jedoch nicht aus.

3.1.2 Homologe Rekombination in den Mutanten von *RECQ4A* und *4B*

Im Zuge dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt, und 2007 in PNAS publiziert werden, dass zwei unabhängige Mutanten von *RECQ4B* erniedrigte Raten an interchromosomaler homologer Rekombination aufweisen, was auf eine HR-fördernde Funktion des Proteins hindeutet (Hartung *et al.*, 2007). Als Assaysystem diente das homozygot eingekreuzte IC9C-Konstrukt, das über X-GlcA-Färbung den Nachweis interchromosomaler HR-Ereignisse in Form blauer Sektoren auf den Keimlingen ermöglicht (Molinier *et al.*, 2004). Verglichen wurden beide Mutanten mit entsprechenden IC9C-Kreuzungen von *recq4A-1* und der Doppelmutante *recq4A-1/4B-2*. Die mit einer HR-fördernden Funktion des Proteins korrelierende erhöhte HR-Frequenz einer *RECQ4A*-Mutante hingegen ist bereits seit 2004 bekannt und entspricht, im völligen Gegensatz zu den hier untersuchten *recq4B*-Linien, dem für andere Organismen mehrfach beschriebenen RecQ-

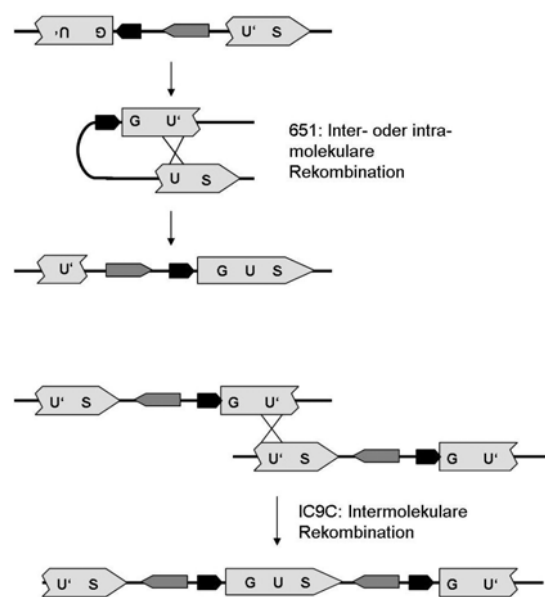


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Assaykonstrukte 651 und IC9C

Beide können homozygot in bestimmte Mutanten eingekreuzt werden um deren Verhalten bezüglich der Raten an homologer Rekombination zu untersuchen. Während das 651-Konstrukt sowohl mit Hilfe intrachromosomaler als auch durch interchromosomale HR mit einem Crossover zur Restauration des Markers führt, wird in den z.B. im Zuge dieser Arbeit untersuchten IC9C-Kreuzungen nur eine Restauration über interchromosomale HR erfasst (nach Swoboda *et al.*, 1994; Molinier *et al.*, 2004).

Phänotyp (Bagherieh-Najjar, 2004). Hinweise auf diesen erstaunlichen *recq4B*-Effekt wurden bereits im Laufe der vorausgegangenen Diplomarbeit erhalten, in der die Mutante *recq4B-2* im Hintergrund eines homozygot eingekreuzten Assaykonstrukts mit *recq4A* verglichen wurde. Dabei hatte die Restauration des β -Glucuronidasegens im sogenannten 651-Konstrukt über sowohl intra- als auch interchromosomale HR in der *recq4B*-Linie seltener stattgefunden als in der entsprechenden Kontrolle. Versuche mit einer solchen *RECQ4B*-Einzelmutante, die die Erfassung rein interchromosomaler HR mit Hilfe des homozygot eingekreuzten IC9C-Konstrukts ermöglicht, hatten diese Daten bestätigt. In dieser Arbeit wurde die Rate interchromosomaler HR in dieser und einer zweiten *recq4B*-Linie sowohl unter normalen Wachstumsbedingungen, als auch unter Induktion zusätzlicher DSBs durch Bleomycin (BLE) bestimmt. Zudem zeigt *recq4A-1* eine schlechte Induzierbarkeit der HR durch das Mutagen, während die IC9C-Kreuzung der Doppelmutante *recq4A-1/4B-2* einen intermediären HR-Phänotyp aufweist. Die Werte von jeweils mindestens sechs Datenreihen sind in Abbildung 16 und Tabelle 2 zusammengefasst.

Abbildung 16: Interchromosomale HR in den Mutanten von *RECQ4A* und *4B*

Die Mutante *recq4A-1* weist im Grundniveau erhöhte HR-Raten auf (Bagherieh-Najjar, 2004), wobei aber die HR durch BLE im Vergleich zur Kontrolle schlechter induzierbar ist. Im Gegensatz dazu deutet in beiden *recq4B*-Linien die erniedrigte HR-Rate auf eine positive Funktion des entsprechenden Proteins in der Rekombination hin.

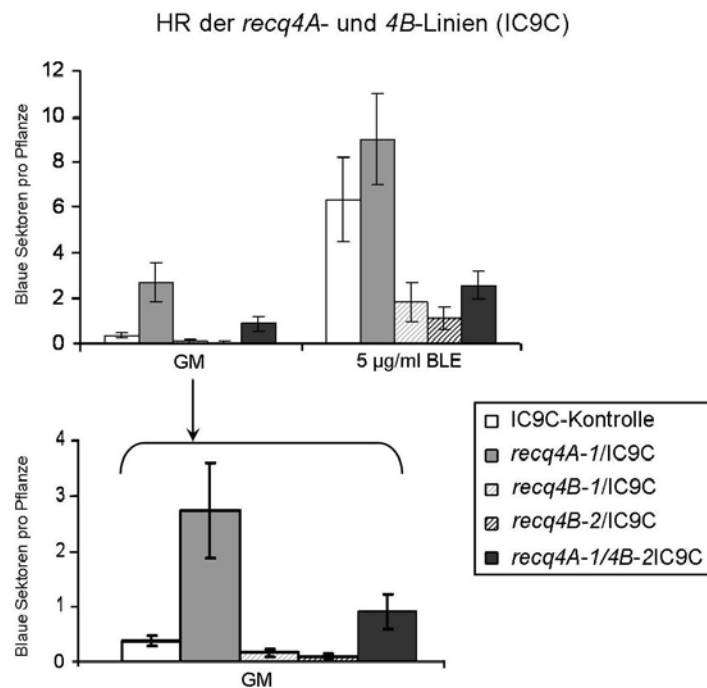


Tabelle 7: Daten zur HR in den *recq4A*- und *4B*-Linien (IC9C)

Bleomycin-induzierte Proben der IC9C-Kreuzungen von *recq4A* und *4B* wurden mit solchen verglichen, die reines Anzuchtmedium (GM) enthielten. Von jeweils mindestens sechs unabhängigen Experimenten wurde jeweils die Anzahl blauer Sektoren pro Pflanze gemittelt. Aus diesen Werten, sowie aus den jeweiligen Induktionsfaktoren pro Experiment und Linie (Verhältnis der blauen Sektoren BLE-induzierte zu unbehandelte Probe) wurden wiederum Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Linie/Mutante	GM	Stdw.	BLE	Stdw.	IF	Stdw.
IC9C-Kontrolle	0,37	0,09	6,36	1,88	17,29	4,25
<i>recq4A-1/IC9C</i>	2,37	0,87	9,02	1,99	3,75	1,20
<i>recq4B-1/IC9C</i>	0,17	0,08	1,85	0,85	11,05	3,76
<i>recq4B-2/IC9C</i>	0,10	0,05	1,16	0,49	15,20	9,50
<i>recq4A-1/4B-2/IC9C</i>	0,91	0,30	2,58	0,60	3,10	1,33

3.2 MUS81 als potenzieller Kandidat eines alternativen HR-Weges

3.2.1 Sensitivität der *mus81*-Mutanten gegenüber genotoxischem Stress

Für zwei unabhängige Mutantenlinien von *MUS81*, die im Zuge dieser Arbeit untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass sie deutliche Schwierigkeiten im Wachstum unter Einfluss von cis-Platin aufweisen. Damit wurde nachgewiesen, dass *MUS81* im Vergleich zu *RECQ4A* nicht nur ähnliche Aufgaben in der DNA-Schadensreparatur besitzt, sondern dass sich die Spektren der Schadenstypen, in deren Reparatur diese Proteine involviert sind, tatsächlich überlappen.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, führt in *mus81-1* und *mus81-2* bereits eine Konzentration von 5 μM cis-Platin zu einem sichtbaren Ausbleichen der Blätter und stark vermindertem Wuchs, während die Kontrolle Col-0 noch keine signifikanten Wachstumsdefizite aufweist. Besonders deutlich werden die Unterschiede nach Behandlung der Pflanzen mit 10 μM cis-Platin. Abhängig von der verwendeten Charge des Mutagens variiert der Grad der Schädigung des Wildtyps zwischen diesen Versuchen und denen, die anhand der *recq4A/4B*-Linien durchgeführt wurden.

Inzwischen publizierte Daten aus der dieser Arbeit vorausgehenden Diplomarbeit belegen, dass *mus81* auch mit deutlichen Sensitivitäten gegenüber den genotoxischen Agenzien MMS und MMC assoziiert ist (Suer, 2005; Hartung *et al.*, 2006). Cis-Platin erzeugt wie MMC Querverknüpfungen der DNA-Basen, allerdings findet hier die Verknüpfung vor allem intramolekular statt. Durch die hier dokumentierten Versuchsreihen konnten also die Informationen über das Spektrum an Schäden, an denen *MUS81* beteiligt ist, erweitert werden. Zudem wurde so ein Vergleich mit Sensitivitäten ermöglicht, die auch für *recq4A* gegenüber cis-Platin erhalten wurden.

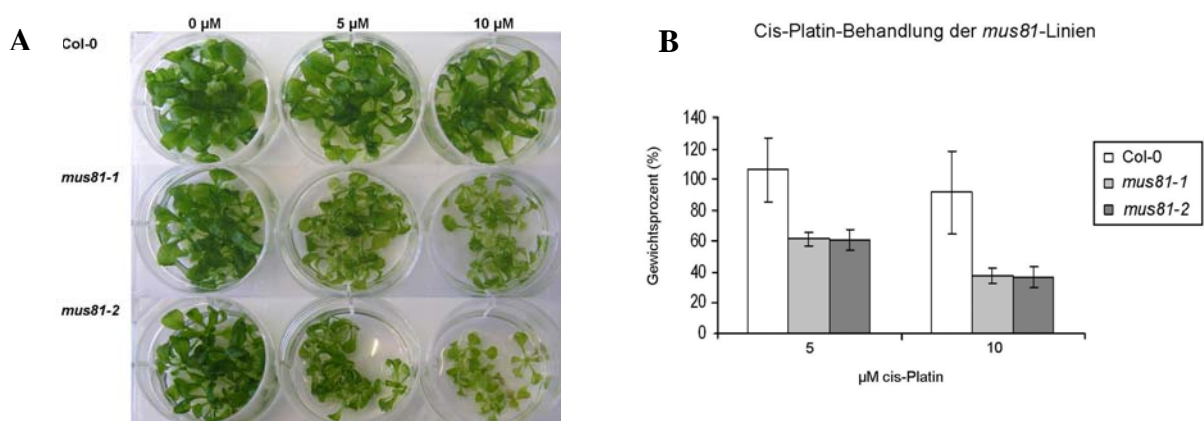


Abbildung 17: Cis-Platin-behandelte Pflanzen von *mus81-1* und -2

(A) Im Vergleich zum Wildtyp Col-0 zeigen beide Mutantenlinien von *MUS81* sowohl bei 5 μM als auch bei 10 μM cis-Platin deutliche Sensitivität gegenüber dem Mutagen. (B) Im Wildtyp ist die durch das Mutagen ausgelöste Hemmung des Wachstums nur schwach und in den hier gezeigten Versuchsreihen selbst bei 10 μM cis-Platin nicht statistisch signifikant. Hingegen werden in beiden *mus81*-Linien bei Behandlung mit 5 und 10 μM cis-Platin nur noch etwa 60 bzw. 40 Prozent des Frischgewichts der jeweils unbehandelten Probe erreicht.

3.2.2 Homologe Rekombination in den *mus81*-Mutanten

Eine Mutation von *MUS81* führt, wie die hier gezeigten Daten belegen, zu Defiziten in der interchromosomalen somatischen HR, was vor allem unter Einwirkung von genotoxischem Stress relevant wird.

Im Gegensatz zu IC9C wird durch ein homozygot eingekreuztes 651-Konstrukt die Erfassung der Rate sowohl intra- als auch intermolekularer HR, durch Restauration eines unterbrochenen β -Glucuronidasegens, ermöglicht. So konnte durch im Rahmen dieser Arbeit erhaltene Ergebnisse bereits 2006 publiziert werden, dass *MUS81* allgemein eine Funktion in der somatischen HR spielt, die vor allem unter Einfluss von genotoxischem Stress durch BLE oder MMC an Bedeutung gewinnt (Hartung *et al.*, 2006). Dieser Effekt ist in Abbildung 18 und Tabelle 3 dargestellt: Während sich bei normalen Wachstumsbedingungen (GM) die Standardabweichungen der Experimente zwischen der 651-Kontrolle und den Kreuzungen mit den *mus81*-Linien überlappen, ist die Induktion der HR unter Einwirkung von BLE in den Mutanten deutlich reduziert.

Abbildung 18: Intra- und interchromosomale HR in den Mutanten von *MUS81*

Während die HR in den *mus81*-Linien bei Wachstum unter normalen Bedingungen (GM) im Vergleich zur Kontrolle unauffällig verläuft, ist die Induktion zusätzlicher Doppelstrangbrüche mit einer erniedrigten HR-Rate beider Mutanten assoziiert. Wie bereits publiziert werden konnte, ist dieser Effekt nicht allein auf die Einwirkung von BLE beschränkt, sondern wird ebenso sichtbar, wenn die Mutanten mit dem Crosslinker MMC behandelt werden (aus Hartung *et al.*, 2006).

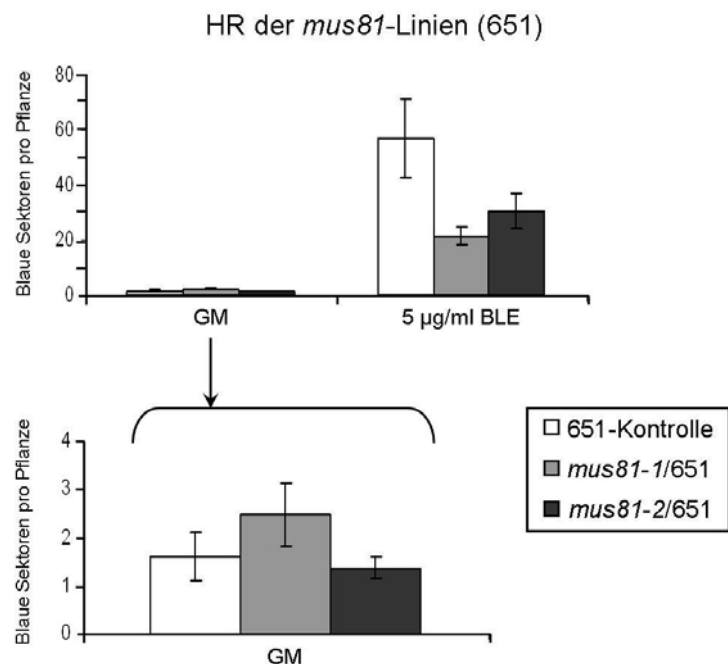


Tabelle 8: Daten zur HR in den *MUS81*-Mutanten (651)

Bleomycin-induzierte Proben der 651-Kreuzungen von *mus81-1* und *-2* wurden, wie auch für die *recq4A-* und *4B*-HR-Linien beschrieben, mit solchen verglichen, die reines Anzuchtmedium (GM) enthielten. Von mindestens sechs unabhängigen Versuchen wurde die Anzahl blauer Sektoren pro Pflanze gemittelt. Aus diesen Werten, sowie aus den jeweiligen Induktionsfaktoren pro Experiment und Linie (s.o.) wurden wiederum Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Linie/Mutante	GM	Stdw.	BLE	Stdw.	IF	Stdw.
651-Kontrolle	1.61	0,51	56,97	14,13	36,88	8,05
<i>mus81-1/651</i>	2,49	0,66	21,77	3,45	9,05	1,45
<i>mus81-2/651</i>	1,38	0,22	30,67	6,40	22,29	3,22

Dass die Funktion des MUS81-Proteins vor allem die HR zwischen Bereichen, die auf unterschiedlichen DNA-Molekülen kodiert sind betrifft, beispielsweise zwischen Schwesterchromatiden oder homologen Chromosomen, wird durch die mit Hilfe der IC9C-Kreuzungen erhaltenen Daten demonstriert und in Abbildung 19 und Tabelle 4 zusammengefasst. Während die erste Linie, *mus81-1* bei Wachstum in gewöhnlichem Anzuchtmedium (GM) nur leicht erniedrigte HR-Raten aufweist, zeigt sich hier in *mus81-2* bereits ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Deutlicher wird dies in beiden Mutantenlinien infolge Bleomycin-induzierter (BLE), zusätzlicher Doppelstrangbrüche.

Abbildung 19: Interchromosomale HR in den Mutanten von MUS81

Im Grundniveau (GM) weist *mus81-1* leicht, und *mus81-2* signifikant erniedrigte Raten interchromosomaler HR auf, die hier durch die Rekonstruktion eines intakten β -Glucuronidase-Gens (vergl. 3.1.2) und anschließende Farbreaktion erfasst wurde. Dass vor allem nach Induktion von genotoxischem Stress in Form von 5 $\mu\text{g/ml}$ BLE die HR im Vergleich zum Wildtyp in beiden Linien drastisch reduziert ist, bestätigt die bereits für entsprechende Kreuzungen mit dem 651-Konstrukt publizierten Daten (Hartung *et al.*, 2006). Zudem zeigen die Werte der IC9C-Kreuzungen, dass die von MUS81 ausgeübte Funktion in der HR vor allem Rekombination zwischen verschiedenen Molekülen, und weniger intramolekulare HR betrifft.

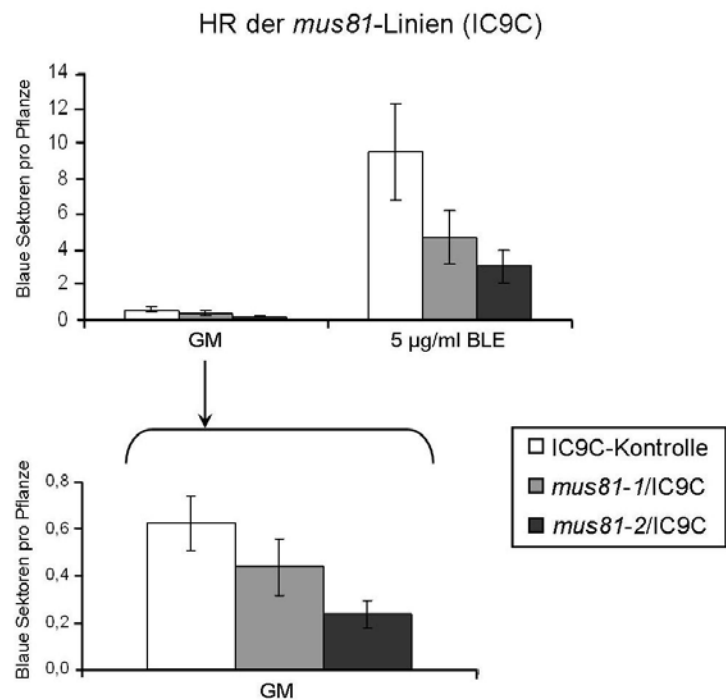


Tabelle 9: Daten zur HR in den MUS81-Mutanten (IC9C)

Interchromosomale HR in den Linien *mus81-1* und *-2* wurde mit Hilfe des homozygot eingekreuzten IC9C-Konstrukts einerseits unter normalen Anzuchtbedingungen, andererseits nach Behandlung mit BLE quantifiziert. Von sechs bis acht unabhängigen Experimenten wurden jeweils die Mittelwerte und Induktionsfaktoren (s.o.) berechnet, und aus diesen Werten wiederum Durchschnittswerte und Standardabweichungen ermittelt.

Linie/Mutante	GM	Stdw.	BLE	Stdw.	IF	Stdw.
IC9C-Kontrolle	0,62	0,12	9,54	2,76	15,47	3,96
<i>mus81-1</i> /IC9C	0,44	0,12	4,71	1,49	11,16	3,35
<i>mus81-2</i> /IC9C	0,24	0,06	3,08	1,49	14,47	7,43

3.2.3 Zusammenhang zwischen *recq4A* und *mus81*

Wie in 3.2.1 und 3.2.2 dokumentiert, weisen RECQ4A und MUS81 überlappende Funktionen in der HR und der Reparatur von DNA-Schäden auf. Um der interessanten Frage nachzugehen, ob beide möglicherweise an parallel verlaufenden Wegen der DNA-Reparatur und –Rekombination beteiligt sind, wie es bereits für RecQ-Helikasen verschiedener Organismen gezeigt werden konnte, wurde *mus81-1* mit *recq4A-1* und einigen weiteren RecQ-Mutanten gekreuzt.

Für Kreuzungen mit Mutanten der Gene *RECQ1*, *RECQ2*, *RECQ4B* und *WRN_{exo}* wurden jeweils doppelt homozygote Pflanzen erhalten (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass diese nicht an einem parallelen Weg beteiligt sein sollten, über den alternativ zur MUS81-Funktion HR-Intermediate prozessiert werden.

Das aus der Kreuzung von *recq4A-1* und *mus81-1* erhaltene Saatgut wurde zunächst vermehrt (= F0) und in der nächsten Generation (= F1) mittels PCR genotypisiert. Von insgesamt 80 in Erde ausgesäten Pflanzen waren drei in ihrem Wachstum auffallend, wobei sie sich durch extreme Kleinwüchsigkeit und schwere somatische Schäden auszeichneten. Alle drei waren laut PCR homozygot für beide Mutationen, und degenerierten in Erde nach kurzer Zeit.

Im Anschluss wurden insgesamt 264 Samen auf Agar-Platten ausgesät. Unter ihnen brachten insgesamt 13 sehr kleine Keimlinge hervor, die ebenfalls nach zwei bis vier Wochen degenerierten und beispielhaft in Abbildung 20 gezeigt sind. Alle betreffenden Keimlinge konnten als doppelt homozygote Nachkommen der Kreuzung eingeordnet werden, während 37 weitere von den gleichen Platten charakterisierte Keimlinge nicht diesem Genotyp entsprachen und normales Wachstum zeigten.

Um die Ursache dieser frühen Letalität genauer einzustufen, wurde eine Kreuzung der homozygot-heterozygoten Doppelmutante mit einer heterozygoten Mutante von *RAD51C* durchgeführt. *RAD51C* gehört zu den *RAD51*-Paralogen, denen eine Funktion bei der Stranginvasion in den homologen Duplex, zu Beginn der HR zugeschrieben wird (Übersicht in Symington, 2005). In *A. thaliana* wurden für *RAD51C* bereits Beteiligungen an sowohl somatischer als auch meiotischer Rekombination nachgewiesen (Abe *et al.*, 2005).

Interessanterweise konnten unter insgesamt 114 Nachkommen der für *mus81* homozygoten sowie für *rad51C* und *recq4A* jeweils heterozygoten Pflanzen acht identifiziert werden, die homozygote Mutationen aller drei betroffenen Gene trugen. Alle acht Pflanzen zeigten normales, mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum bis hin zur Entwicklung von Schoten. Eine schließlich beobachtete Sterilität ist, wie durch DAPI-Färbung der Chromosomen während der Pollenentwicklung gezeigt, auf dieselben Ursachen zurück zu führen wie in der bereits charakterisierten *RAD51C*-Einzelmutante (Abe *et al.*, 2005). Diese äußert sich in dem Fehlen von Bivalenten in der Diakinese, sowie starken Fragmentierungen in Anaphase I und II. Anstelle der im Wildtyp in Telophase II gebildeten Tetraden entstehen durch zufällige Verteilung der fragmentierten Chromosomen sowohl in der Einzel- als auch

in der Dreifachmutante Polyaden. Abbildungen 20 bis 22 fassen diese Ergebnisse zusammen. Folglich muss die Letalität von *mus81-1/recq4A-1* auf fehlerhafte somatische HR zurückzuführen sein, die sich umgehen lässt, wenn frühe HR-Gene nicht exprimiert werden können. Im Gegensatz dazu ist *RAD51C* für die korrekt verlaufende HR in der Meiose essentiell, weshalb hier über eine meiotische Funktion von *MUS81* oder *RECQ4A* keine Aussage getroffen werden kann.

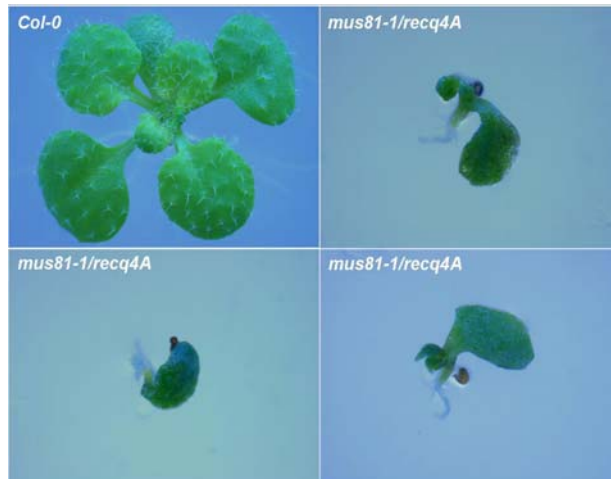


Abbildung 20: Letalität der Doppelmutante von *mus81* und *recq4A*

Gezeigt sind ca. zwei Wochen alte, auf GM-Platten angezogene Keimlinge. Während der Wildtyp Col-0 bereits gut entwickelte, grüne Blätter aufweist, zeigt die Doppelmutante schwere Entwicklungsdefekte. Die meisten Keimlinge degenerieren etwa zwei bis vier Wochen nach ihrer Aussaat, nur wenige entwickeln in Erde mehrere Blätter oder sehr kurze Blütentriebe (siehe Abb. 11), weisen dabei aber schwere somatische Schäden auf (aus Hartung *et al.*, 2006).

Abbildung 21: Aufhebung der Letalität von *mus81-1/recq4A-1* durch *rad51C*

Gezeigt sind Nachkommen der Dreifachkreuzung *mus81-1/rad51C/recq4A-1*, in der die Mutationen von *RAD51C* und *RECQ4A* nur heterozygot vorliegen. Während der Ausgangsgenotyp (A) keinerlei Auffälligkeiten in seinem Wachstum aufweist und gesunde Schoten ausbildet, überleben nur sehr wenige für *mus81* und *recq4A* homozygote, nicht *rad51C*-homozygote Pflanzen in Erde. Diese weisen schwere somatische Schäden auf und degenerieren meistens innerhalb weniger Wochen (B). In (C) und (D) sind Beispiele der dreifach homozygoten Mutanten gezeigt. Durch das Ausschalten des frühen HR-Gens *RAD51C* wird der mit Letalität verbundene Defekt der Doppelmutante *mus81/recq4A* aufgehoben; die Pflanzen wachsen unauffällig bis zur Entwicklung von Blüten und Schoten, und weisen die für *rad51C* beschriebenen meiotischen Defekte auf (Abe *et al.*, 2005).

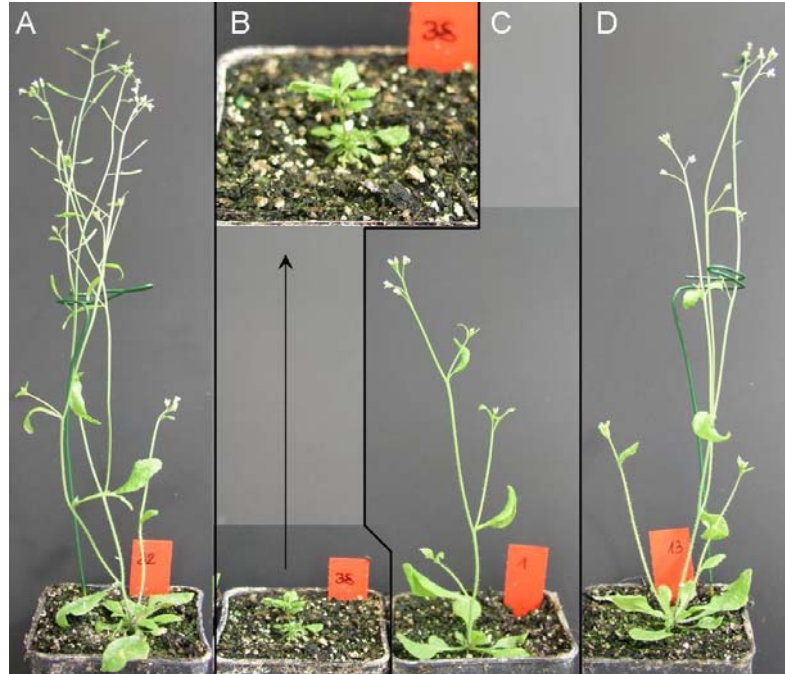
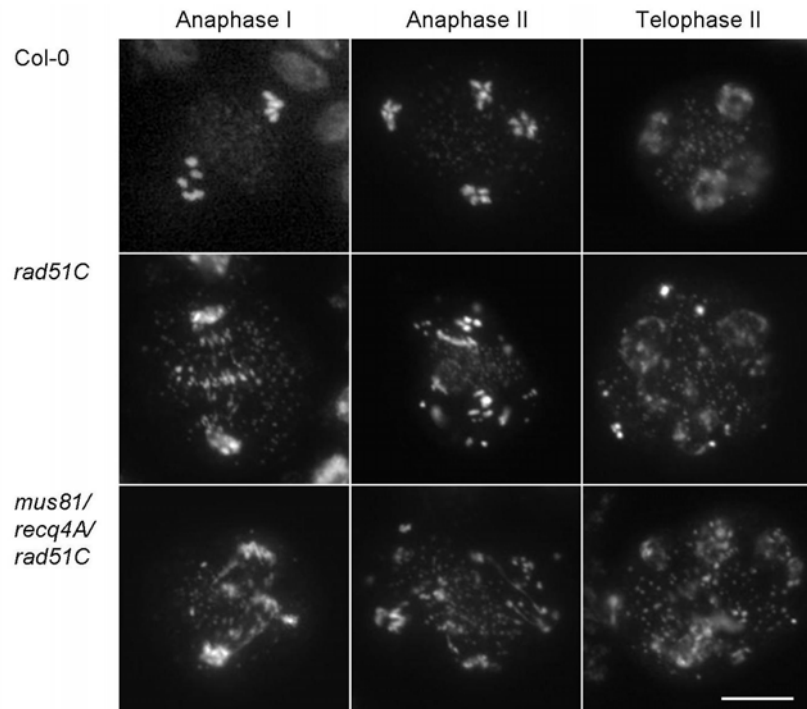


Abbildung 22: Meiotische Defekte in der Dreifachmutante *mus81-1/recq4A-1/rad51C*

Gezeigt sind DAPI-Präparationen der meiotischen Stadien in Pollenmutterzellen. Die Dreifachmutante zeigt die für *rad51C* beschriebenen meiotischen Defekte (Abe *et al.*, 2005), die sich in unter anderem in Fragmentierungen der Chromosomen in Anaphase I und II, sowie der Bildung von Polyaden anstelle von Tetraden in Telophase II äußern. Der weiße Balken entspricht 10 µm.



Es konnte also gezeigt werden, dass RECQ4A im Gegensatz zu RECQ4B tatsächlich an einem Weg beteiligt ist, über den in somatischen Zellen alternativ zur Spaltung durch MUS81 HR-Intermediate prozessiert werden. Da diese RecQ-Funktion evolutionär konserviert ist, und in Mensch und Hefe als Interaktionspartner RMI1 und eine Typ 1A-Topoisomerase erfordert, stellt sich die Frage nach möglichen Interaktionspartnern in Arabidopsis.

3.3 *RMI1* – Ein Gen, zwei Phänotypen

3.3.1 Bestimmung der T-DNA-Insertionsorte in *rmi1-1* und *rmi1-2*

Im Genom von *A. thaliana* sind zwei potenzielle *RMI1*-Gene kodiert, At1g19950 und At5g63540. Mutanten des erstgenannten Gens zeigen in ihrem Wachstum auf Agarplatten oder in Erde keinerlei Auffälligkeiten, sind fertil und geben keine Hinweise auf Sensitivitäten gegenüber genotoxischen Agenzien (Daten nicht gezeigt). Deshalb sollte in dieser Arbeit nur At5g63540 als *RMI1*-Homolog und potenzielle Komponente eines konservierten RTR-Komplexes charakterisiert werden.

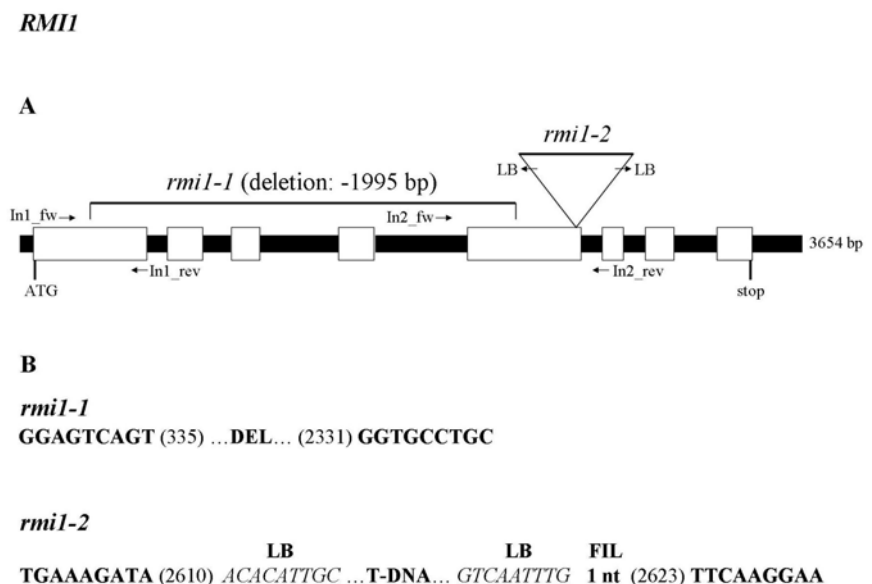
Zwei T-DNA-Insertionslinien wurden deshalb aus der SALK-Kollektion bestellt, SALK_093589 und SALK_094387, und ihre genauen Insertionsorte mit Hilfe der in der Datenbank angegebenen Informationen, wie im Methodik-Abschnitt beschrieben, untersucht.

Die Mutantenlinie SALK_093589 wird in dieser Arbeit als *rmi1-1* bezeichnet und weist, wie in Abbildung 23 schematisch dargestellt ist, im *RMII*-Gen zwischen dem ersten und fünften Exon eine Deletion von 1995 Basenpaaren auf. Im Zuge dieser Deletion ging die entsprechende T-DNA vollständig verloren, so dass die beidseitig angrenzenden Bereiche der genomischen Sequenz entsprechen. Da dasselbe Saatgut als Ausgangsmaterial in einer anderen Arbeitsgruppe zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Insertionsorts-Charakterisierung führte (Grelon, persönliche Kommunikation), wurde das Originalsaatgut noch einmal ausgesät und die Pflanzen einzeln auf das Vorhandensein von „Left-Border“ (LB) oder „Right-Border“ (RB) -Sequenzen hin untersucht. Tatsächlich konnte eine Mischung verschiedener LB-RB-Kombinationen gefunden werden (Daten nicht gezeigt), die die Verwendung unterschiedlicher Mutantenlinien aus gleicher Quelle erklärt. Aufgrund der großen Deletion ist in der hier beschriebenen Linie *rmi1-1* aber damit zu rechnen, dass diese am ehesten einem Knockout entspricht. Deshalb wurde diese Linie weiter kultiviert und im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert.

SALK_094387 wird in der vorliegenden Arbeit als *rmi1-2* bezeichnet und besitzt eine T-DNA-Insertion am Ende des fünften Exons. Diese Insertion zeichnet sich durch zwei entgegengesetzt orientierte T-DNA-Sequenzen aus, deren LB-Bereiche nach außen gerichtet sind. Am hinteren Übergang zwischen Insertion und genomischer Sequenz befindet sich eine sogenannte „Filler-Sequenz“ von nur einem Nukleotid, das weder der T-DNA, noch der *RMII*-Sequenz in diesem Bereich entspricht.

Abbildung 23: T-DNA-Insertionsorte in *rmi1-1* und *rmi1-2*

(A) In *rmi1-1* wurde die T-DNA gemeinsam mit einem 1995 bp großen Bereich des Gens, der zwischen Exon 1 und Exon 5 liegt, deletiert. In *rmi1-2* hingegen befindet sich eine aus zwei entgegengesetzt orientierten T-DNA-Sequenzen bestehende Insertion am Ende des fünften Exons. Dabei sind jeweils die LB-Sequenzen zur genomischen *RMII*-Sequenz gerichtet. In (B) sind die Übergänge zwischen genomischer Sequenz und den beiden Mutationsorten gezeigt. Primersequenzen siehe 2.5.1.



3.3.2 Expression von *RMI1* in den Mutantenlinien *rmi1-1* und *rmi1-2*

Um eine Expression von *RMI1* in den Mutanten zu untersuchen wurde zunächst RNA aus Blüten gewonnen und diese in cDNA umgeschrieben. Durch Auswahl entsprechender Primer sollte gezeigt werden, ob vor, über oder hinter den jeweiligen Insertion- oder Deletionsorten noch Expression in den Mutanten stattfindet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 gezeigt. Wie zu erwarten wird in *rmi1-1* und *rmi1-2* jeweils vor der Deletion bzw. Insertion noch eine Bande

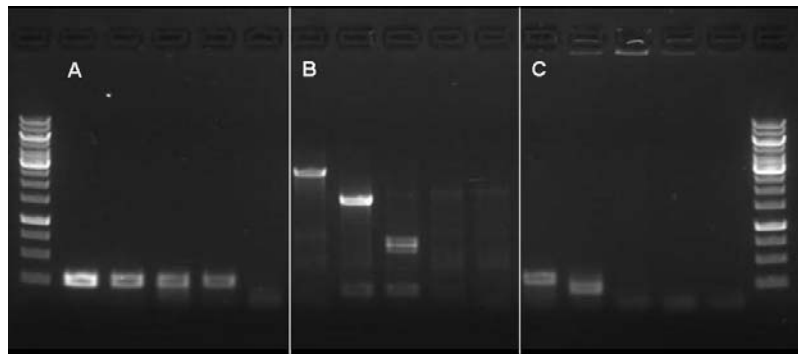


Abbildung 24: RT-PCR zur Bestimmung der *RMI1*-Expression in den Mutanten

Getestet wurde jeweils (von links) Col-0 genomisch, Col-0 cDNA, *rmi1-1* cDNA, *rmi1-2* cDNA und Mastermix ohne DNA. (A) Mit der Primerkombination 1 (vergl. Tabelle in 2.5.2) wird in allen Linien die Expression vor den zu erwartenden Mutationsorten nachgewiesen. (B) Mit Primerpaar 2 tritt in der ersten Mutante eine durch die Deletion verkürzte Bande auf. In der zweiten Linie sieht man hier hingegen keine Bande. (C) Hinter der Deletion in *rmi1-1* bzw. der Insertion in *rmi1-2* ist keine Expression mehr nachweisbar, hier gezeigt durch Verwendung von Primerpaar 3. Die für das Umschreiben in cDNA verwendete RNA wurde jeweils aus Blüten gewonnen.

erhalten. In *rmi1-1* führt die Verwendung der vor und nach der Deletion bindenden Oligonukleotide zu einer aus der DNA-Sequenz vorhersagbaren, verkürzten PCR-Bande. Dies zeigt, dass zwar eine Transkription des *RMI1*-Gens stattfindet, ein potenziell entstehendes Protein jedoch durch das Fehlen großer Bereiche kaum mehr funktionell sein kann. Dass zudem die *RMI1*-Transkription abbricht, wird durch hinter dem deletierten Bereich bindende Oligonukleotide nachgewiesen.

Bei Verwendung von Primern, die in *rmi1-2* vor und hinter der T-DNA-Insertion binden wird kein PCR-Signal erhalten. Dementsprechend könnte einerseits die Insertion in der RNA, wie auf DNA-Ebene gezeigt, weiterhin bzw. teilweise enthalten sein. Eine PCR-Bande wäre so aufgrund der gewählten Amplifikationszeit in dieser Linie nicht zu erwarten. Andererseits könnte die Transkription bereits vor der Bindestelle des Reverse-Primers zu einem Abbruch kommen. Passend zu letzterer Erklärung, ist hinter der Insertion keine Expression mehr nachweisbar. Es ist also zu erwarten, dass in *rmi1-2* maximal ein verkürztes RMI1-Protein gebildet wird, das im Vergleich zum RMI1 des Wildtyps seine Funktionen nur teilweise oder weniger effizient wahrnehmen kann.

3.3.3 In *rmi1-1* und *rmi1-2* ist die Fertilität unterschiedlich stark eingeschränkt

Bei Anzucht der Pflanzen in Erde konnte beobachtet werden, dass *rmi1-1* nur Stummelschoten bildet, während *rmi1-2* in diesem Stadium auf den ersten Blick nicht vom Wildtyp zu unterscheiden ist. Diese Unterschiede zweier Mutanten eines Gens bezüglich ihrer Fertilität sollten deshalb zunächst durch mikroskopische Methoden zur Beschreibung der Pollenbildung und –lebensfähigkeit genauer eingestuft werden.

Bei der sogenannten Alexanderfärbung (Alexander, 1969), die anhand der *rmi1*-Linien in Abbildung 25 gezeigt ist, wird die Cellulose in der Pollenwand mit Hilfe von Malachitgrün angefärbt. Gleichzeitig erscheint das Cytoplasma lebensfähiger Pollenkörner unter Einwirkung von Fuchsin dunkel violett, was die grüne Farbe überlagert. So kann theoretisch zwischen intakten (violetten) und degenerierten (grünen) Pollenkörnern unterschieden werden. In verschlossenen Staubbeuteln dringt der Farbstoff allerdings nicht sehr effizient ins Innere, weshalb der Nachweis der Lebensfähigkeit nicht vollständig erfolgt. Dennoch kann mit Hilfe dieser Methode klar veranschaulicht werden, dass die Produktion von Pollenkörnern in der ersten Mutante stark eingeschränkt ist, und die verhältnismäßig kleinen Staubbeutel nur deformierte, oftmals zu groß erscheinende Pollenkörner enthalten. Die Pollenproduktion der zweiten *RMI1*-Mutante hingegen erscheint normal und ist durch Alexanderfärbung nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

Abbildung 25: Alexanderfärbung von Antheren der *RMI1*-Mutanten

In der ersten Mutante, *rmi1-1*, entstehen nur wenige Pollen. Diese zeigen ganz unterschiedliche Größen, sind deformiert und oftmals nicht lebensfähig. In *rmi1-2* hingegen erscheint die Pollenproduktion zunächst unauffällig.



Der Nachweis der Lebensfähigkeit sollte im nächsten Schritt an präparativ freigelegten Pollenkörnern durch Fluoreszenzmikroskopie erfolgen und ist in Abbildung 26 gezeigt. Bei dieser Methode wird Fluorescein-Diacetat nach Aufnahme in die Zellen nur in diesen zurückgehalten, wenn die Zellmembran intakt ist. Unspezifische Esterasen entfernen dann den Diacetat-Rest vom Molekül und setzen das unter UV-Bestrahlung photoaktive Fluorescein frei. So erscheinen im Fluoreszenzmikroskop unter UV-Anregung nur lebensfähige Pollenkörner leuchtend grün (Heslop-Harrison und Heslop-Harrison, 1970). Tatsächlich zeigt sich in *rmi1-1* eine deutlich geringere Anzahl an Pollenkörnern pro Anthere, wobei nur sehr wenige grün fluoreszierende Exemplare zu finden sind.

Diese sind oftmals deformiert und im Vergleich zu den Wildtyp-Pollen auffällig groß, was vermuten lässt, dass sie nicht mehr funktionsfähig sind. Auch die nicht oder nur sehr schwach fluoreszierenden, in *rmi1-1* gebildeten Pollenkörner weisen schon im Hellfeld ungewöhnliche Formen und eine hohe Varianz bezüglich ihrer Größe auf.

Wie aus der Alexanderfärbung zunächst zu erwarten, ist die Pollenproduktion in *rmi1-2* etwa mit der des Wildtyps zu vergleichen, auch wenn hier nur der optische Eindruck zu vermerken ist und keine genaue Quantifizierung stattfand. Allerdings ist hier häufiger zu beobachten, dass Pollenkörner nach Behandlung mit Fluorescein-Diacetat nicht fluoreszieren und demnach degeneriert sind. Passenderweise ergab eine statistische Auswertung der Samen pro Schote einen Wert von durchschnittlich 27,55 ($\pm 3,54$) in *rmi1-2* gegenüber 56,78 ($\pm 3,54$) im Wildtyp Col-0. Die zweite *RMII*-Linie ist also mit einer Samenproduktion von nur 48,5 Prozent des Wildtyps teilweise steril, *rmi1-1* hingegen vollständig.

Abbildung 26: Fluorescein-Diacetat-Färbung von *rmi1*-Pollen

Lebensfähige Pollen fluoreszieren grün (links), hingegen sind abgestorbene nur im Hellfeld (rechts) klar zu erkennen. Während die zweite Linie, *rmi1-2* im Verhältnis zum Wildtyp nur eine leicht reduzierte Anzahl lebensfähiger Pollen ausweist, werden in der ersten Linie, *rmi1-1* fast gar keine inakten Pollen gebildet. Der weiße Balken entspricht 200 μm ; die Bilder wurden mit einer Schwarzweiß-Kamera aufgenommen und farblich nachbearbeitet.

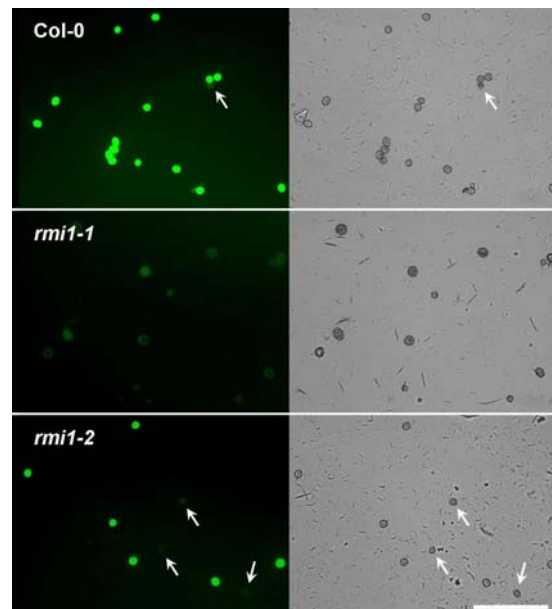
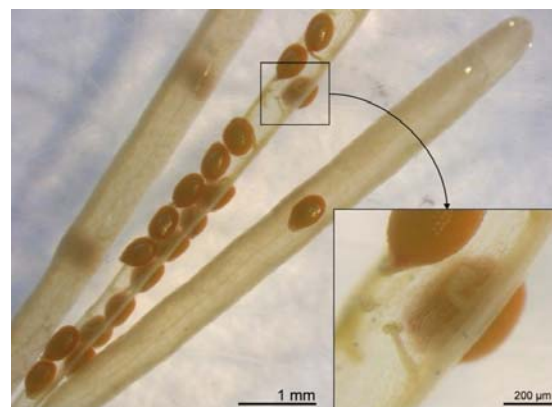


Abbildung 27: Degenerierte Samenanlagen in Schoten von *rmi1-2*

Auf den ersten Blick erscheinen die Schoten der zweiten *RMII*-Mutante wie die des Wildtyps. Allerdings befinden sich im Inneren der Schoten freie Plätze zwischen den normal entwickelten Samen, die bei Betrachtung durch ein Binokular als degenerierte Samenanlagen eingeordnet werden können. Wie im Text erläutert, ist im Verhältnis zu Col-0 die Samenproduktion pro Schote um etwa die Hälfte reduziert.



3.4 Meiotische Untersuchungen der *rmi1*- und *top3 α* -Mutantenlinien

RecQ-Helikasen sind bei Mensch und Hefe gemeinsam mit RMI1 und der Typ IA –Topoisomerase TOP3 α in einen konservierten Komplex involviert, der rekombinante DNA-Strukturen in der somatischen und möglicherweise auch meiotischen HR auflöst. In *A. thaliana* konnte für TOP3 α bereits eine essentielle meiotische Funktion nachgewiesen werden, die im Falle einer Mutation in *top3 α -2* zu starker Brückenbildung und Fragmentierung der Chromosomen führt (Wurz-Wildersinn, 2007). In dieser Arbeit wurden zwei unabhängige Mutanten von *RMI1* untersucht, die wie in 3.3 dargestellt, in unterschiedlichem Maße Fertilitätsstörungen aufweisen. Um diese Defekte genauer zu charakterisieren, wurde einerseits getestet, ob bei einer Mutation von *RMI1* neben der Pollenbildung auch die Ausbildung der Samenanlagen gestört ist. Andererseits sollte durch DAPI-Präparation von Meiosestadien in Pollenmutterzellen der Ursache der meiotischen Probleme nachgegangen werden. Dabei sollte zudem ein Zusammenhang zwischen potenziellen meiotischen Funktionen von RMI1, TOP3 α und RECQ4A untersucht werden.

3.4.1 Entwicklung des weiblichen Gametophyten in *rmi1-1*

Wie in 3.3 anhand verschiedener Methoden der Pollenfärbung und der statistischen Auswertung der Samenproduktion pro Schote gezeigt wurde, führt eine Mutation des *RMI1*-Gens zu Defekten in der Entwicklung der Keimzellen. Ob allein die meiotische Teilung in den Pollenmutterzellen betroffen ist, oder ob ebenso die Entwicklung des weiblichen Gametophyten gestört ist, sollte anhand der fataleren Mutante, *rmi1-1*, durch DIC-Mikroskopie untersucht werden.

Während der Entwicklung der Samenanlagen des Wildtyps durchläuft die Embryosackmutterzelle eine meiotische Teilung. Von den entstehenden vier haploiden Produkten dieser Teilung gehen drei zugrunde, die vierte stellt die sogenannte Embryosackzelle dar. Diese teilt sich zweimal mitotisch, wobei im weiblichen Gametophyten ein charakteristisches Bild entsteht: Nach der ersten Teilung wandern die beiden entstandenen Kerne auseinander; zwischen ihnen wird im DIC-Mikroskop eine große Vakuole erkennbar. Nach der zweiten Teilung sind deutlich vier Kerne zu erkennen, wie in Abbildung 28 D gezeigt. Im Anschluss an diese charakteristischen Stadien resultieren im Wildtyp aus einer weiteren mitotischen Teilung schließlich acht Kerne, aus denen sich Eizelle, Synergiden und Antipoden entwickeln.

In der männlich sterilen Mutante *rmi1-1* konnte im Zuge dieser Arbeit ebenfalls weibliche Sterilität beobachtet werden: Aus der meiotischen Teilung der Embryosackmutterzelle geht zwar in einigen Fällen noch ein Embryosackkern hervor, der auch oftmals noch über eine Weile hinweg bestehen

bleibt (Abbildung 28 E-H). Da dieser sich aber nicht mehr teilt, ist davon auszugehen, dass die ihm vorausgegangene Meiose bereits fehlerhaft verlief. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung der Samenanlagen von *rmi1-1* degenerieren diese zudem. Ein vier- oder achtkerniges Stadium, das die Grundlage für die Entwicklung des befruchtungsfähigen Gametophyten darstellt, konnte im Laufe der Präparationen in dieser Mutante niemals beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind im Vergleich zum Wildtyp Col-0 in Abbildung 28 gezeigt.

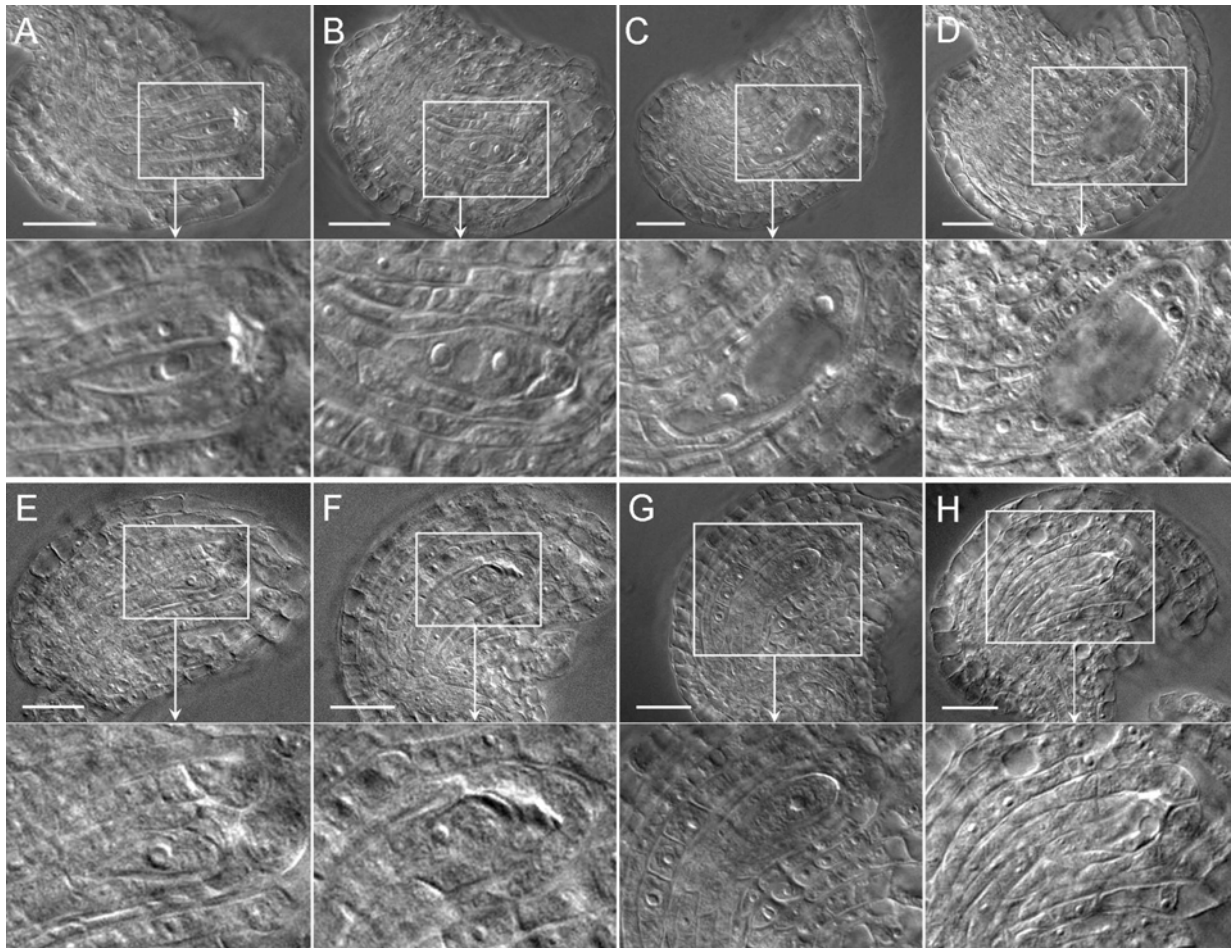


Abbildung 28: Entwicklung des weiblichen Gametophyten in *rmi1-1*

Im Wildtyp Col-0 entsteht aus einer meiotischen Teilung der Embryosackmutterzelle die sogenannte Embryosackzelle (A), während die drei anderen der vier haploiden meiotischen Produkte zugrunde gehen. Die Embryosackmutterzelle teilt sich mitotisch (B), und die zwei Tochterkerne wandern in entgegengesetzte Richtungen (C). Dort teilen sie sich wiederum, wodurch im DIC-Mikroskop deutlich vier Kerne in charakteristischer Anordnung zu erkennen sind (D). Durch eine weitere mitotische Teilung der vier Kerne entstehen acht, aus denen sich schließlich der befruchtungsfähige Eiapparat entwickelt, bestehend aus Eizelle, Synergiden und Antipoden. Letztere Stadien sind hier nicht gezeigt, da die Zellen im Mikroskop in unterschiedlichen Fokusebenen erscheinen. In der Mutante *rmi1-1* ist als einziges Produkt der meiotischen Teilung in einigen Samenanlagen noch ein Embryosackkern zu erkennen (E). Dieser kann zwar während des weiteren Wachstums der Samenanlage kürzer oder länger bestehen bleiben, teilt sich aber nicht mehr (F-H). Stattdessen findet eine Degeneration des weiblichen Gametophyten statt, woraus zu folgern ist, dass bereits die meiotische Teilung der Embryosackmutterzelle fehlerhaft verläuft. Der weiße Balken entspricht jeweils 20 μm , die mit weißen Rahmen umgebenen Ausschnitte sind jeweils wiederum 2-3fach vergrößert dargestellt.

3.4.2 Meiotischer Defekt von *rmi1-1* verglichen mit *top3 α -2*

Die meiotische Teilung der Pollenmutterzellen wurde mit Hilfe von DAPI-Präparaten mikroskopisch untersucht, um den Defekt, der sich in männlicher und weiblicher Sterilität der Mutantenlinie *rmi1-1* äußert, genauer charakterisieren zu können. Als Kontrollen wurden der Wildtyp und *recq4A-1* verwendet. Von dieser Mutante konnten keine Fertilitätsstörungen detektiert werden; weder durch DAPI-Färbung der Meiosestadien in der Pollenentwicklung, noch durch Beobachtung der Schotenentwicklung und Samenproduktion.

Die Mutante *top3 α -2* zeichnet sich durch schwere Fragmentierungen und Brückenbildung der Chromosomen in der ersten meiotischen Teilung aus, und wurde von Rebecca Wurz-Wildersinn diesbezüglich charakterisiert (Wurz-Wildersinn, 2007). Da RMI1 und TOP3 α in Hefe und Mensch in einem konservierten Komplex an der HR beteiligt sind, sollte der meiotische Defekt der Arabidopsis-Linie *rmi1-1* an dieser Stelle ebenfalls mit *top3 α -2* verglichen werden.

Bereits während der Diakinese sind in *rmi1-1* erste Defekte zu erkennen. In diesem Stadium liegen die homologen Chromosomen im Wildtyp gepaart vor, wobei fünf Päckchen, jeweils bestehend aus den vier stark kondensierten Chromatiden, klar erkennbar im Kern verteilt sind. Die Chromosomen der Mutante *rmi1-1* bilden stattdessen weniger glattrandig erscheinende, ungleichmäßige Aggregate aus, die in ihrer Zahl meistens fünf übertreffen.

In der Anaphase I, die sich durch die Trennung der homologen Chromosomen auszeichnet, ist eine starke Fragmentierung der Chromosomen zu beobachten, wobei die Fragmente teilweise zu den Polen gezogen werden, und teilweise in der Äquatorialebene verbleiben. In der Telophase I wird die meiotische Teilung dieser Mutante abgebrochen, es konnte im Zuge der in dieser Arbeit durchgeführten Präparationen kein späteres Stadium beobachtet werden. Dieser meiotische Arrest nach der ersten, fehlerhaften Teilung ist unter den für Arabidopsis beschriebenen sterilen Mutantenlinien einzigartig, und konnte abgesehen von *rmi1-1* bisher nur für *top3 α -2* beschrieben werden (Wurz-Wildersinn, 2007). Am Ende der Meiose der Pollenmutterzelle entstehen in beiden Mutanten Diaden anstelle der im Wildtyp gebildeten Tetraden.

Bestätigt werden die hier vorgestellten Ergebnisse dadurch, dass auch in *rmi1-2* passend zur teilweisen Sterilität ein Teil der Meiosen defekt verläuft und dabei mit *rmi1-1* vergleichbare, charakteristische Meiosestadien in den entsprechenden DAPI-Präparationen zu beobachten sind (Hartung *et al.*, 2008, im Reviewprozess).

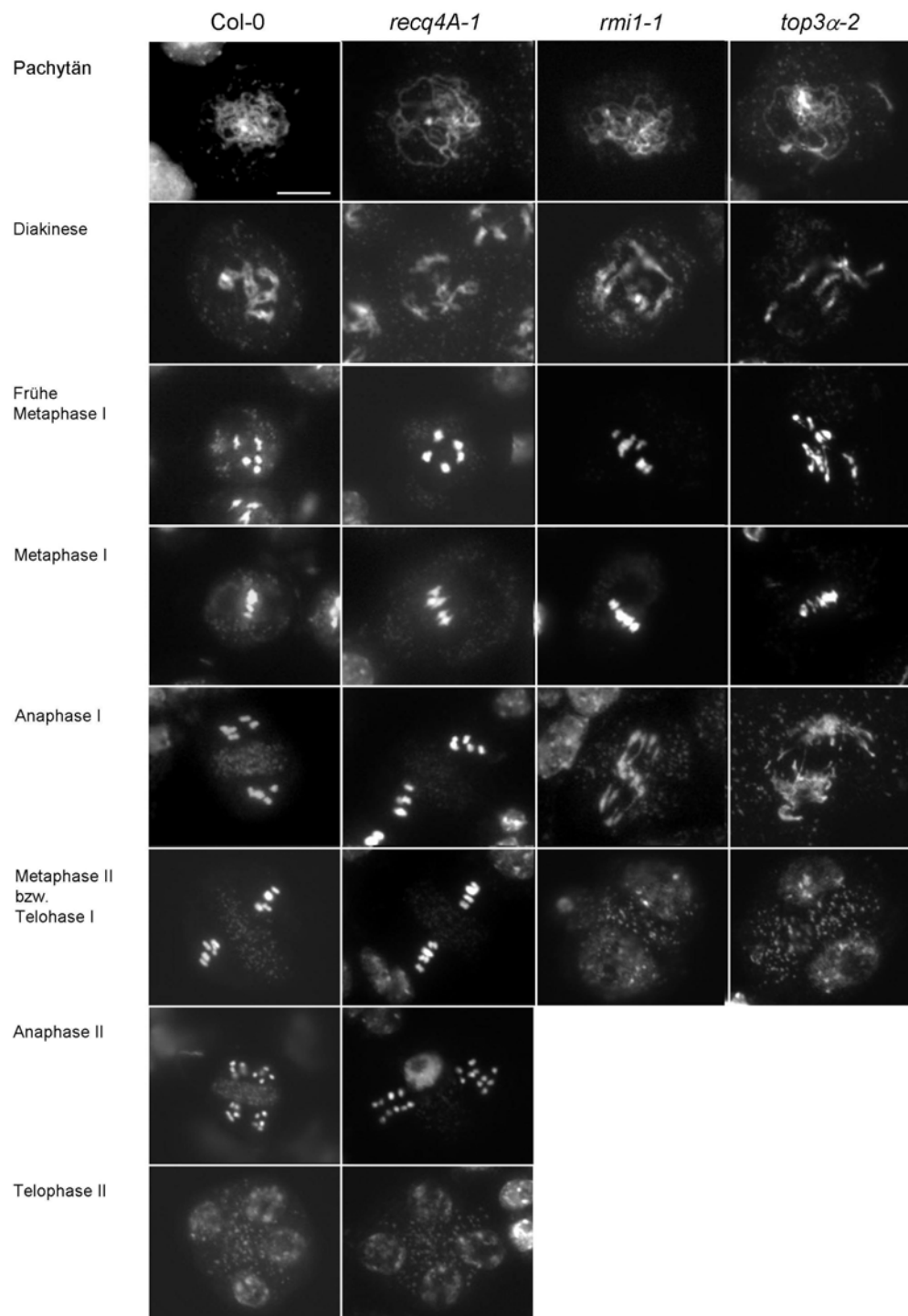


Abbildung 29: Meiose in *rmi1-1* im Vergleich zu Col-0, *recq4A-1* und *top3α-2*

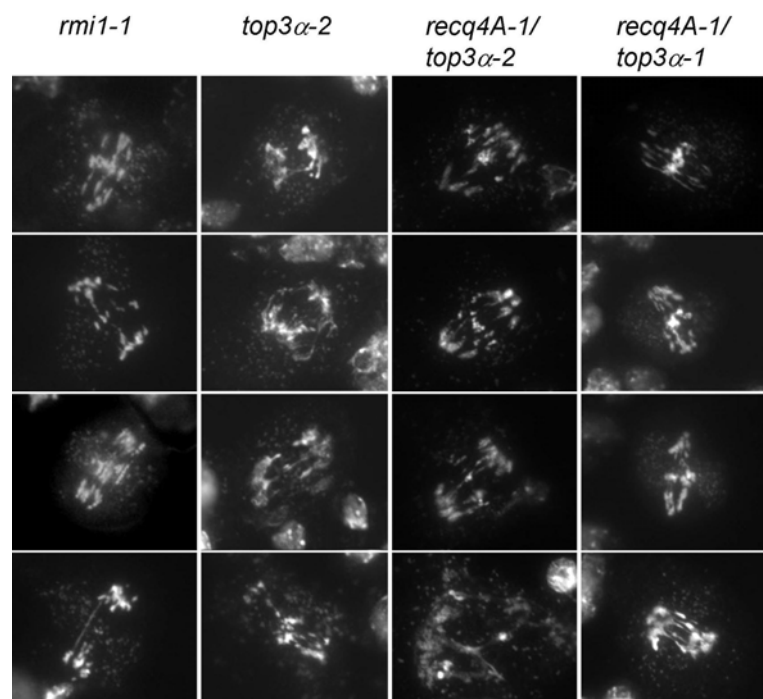
Wie im Wildtyp durchläuft *recq4A-1* in der Pollentwicklung eine korrekte meiotische Teilung. Dabei findet zunächst eine Paarung der homologen Chromosomen statt, die in der Diakinese nur noch an den Chiasmata verknüpft sind und stärker kondensiert im Kern verteilt liegen. Nach Anordnung in der Äquatorialebene während der Metaphase I werden die Homologen getrennt und zu den Polen gezogen. In der zweiten meiotischen Teilung findet anschließend eine Trennung der Chromatiden statt, so dass am Ende vier haploide Meiosporen entstehen. In *rmi1-1* ist ein meiotischer Defekt zu beobachten, der dem für *top3α-2* beschrieben (Wurz-Wildersinn, 2007) stark ähnelt: Nachdem bereits Diakinese und Metaphase I ungewöhnlich und ungleichmäßig erscheinen, wird in Anaphase I eine starke Fragmentierung der Chromosomen erkennbar. Teile der Chromosomen verbleiben in der Metaphaseplatte, und anstelle des Übergangs zu Metaphase II findet hier bereits in der Telohase I ein meiotischer Arrest statt. Der weiße Balken entspricht 10 µm.

Abbildung 29 zeigt den korrekten Ablauf der meiotischen Teilung im Wildtyp und der fertilen Mutante *recq4A-1*, sowie die meiotischen Defekte von *rmi1-1* und *top3 α -2*. Die starke Ähnlichkeit dieser Phänotypen lässt auf eine gemeinsame Funktion beider Proteine bei der Auflösung von DNA-Strukturen während der meiotischen Rekombination schließen, an der RECQ4A nicht oder nicht essentiell beteiligt ist.

Kürzlich konnte allerdings innerhalb dieser Arbeitsgruppe eine Doppelmutante von *recq4A-1* isoliert werden, die den letalen Phänotyp der Mutante *top3 α -1* aufhebt (Hartung *et al.*, 2007). Dementsprechend müssen beide Proteine in der vegetativen Entwicklung von *A. thaliana* tatsächlich Funktionen in einem gemeinsamen DNA-Reparaturweg ausüben, passend zu den von Mensch und Hefe erhaltenen Daten (vergl. 1.2.4). Obwohl für *recq4A-1* allein kein meiotischer Phänotyp detektiert werden konnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Einfluss dieser Mutation auf den meiotischen Defekt untersucht werden, der von einer Mutation des *TOP3 α* -Gens hervorgerufen wird. In Abbildung 30 sind beispielhaft jeweils vier Anaphase I –Stadien der Arabidopsis-Linien *rmi1-1*, *top3 α -2*, *recq4A-1/top3 α -2* und *recq4A-1/top3 α -1* gezeigt. Alle vier Linien sind in ihrem meiotischen Phänotyp einander stark ähnlich und zeichnen sich durch schwerwiegende chromosomale Fragmentierung aus, die in Anaphase I deutlich wird und oftmals eine unvollständige Verteilung des genetischen Materials bewirkt.

Abbildung 30: Anaphase I in *rmi1-1* und den Doppelmutanten von *top3 α* und *recq4A*

Die Chromosomen-Fragmentierung der Mutanten *rmi1-1* und *top3 α -2* in Anaphase I wurde mit entsprechenden Stadien von *top3 α* -Doppelmutanten mit *recq4A-1* verglichen. Die Mutation von *RECQ4A* kann den somatischen Defekt der letalen, ersten Mutante von *top3 α* mildern. Diese Pflanzen sind steril und zeigen einen Wachstums-Defekt, der dem der *top3 α -2*-Linie stark ähnelt, weshalb beide Proteine in somatischen Zellen gemeinsam an einem DNA-Reparaturweg beteiligt sein müssen. Auf den hier demonstrierten Anaphase I –Defekt einer *top3 α* -Mutation hat *recq4A* jedoch keinen Einfluss. Alle untersuchten Mutanten zeigen den gleichen meiotischen Phänotyp.



Es konnte hier also eindeutig gezeigt werden, dass die mit Sterilität der Pflanzen verbundenen Mutationen von *TOP3 α* und *RMII* auf einen ähnlichen meiotischen Defekt zurückzuführen sind. Beide Proteine spielen eine Rolle in einem meiotischen Rekombinationsweg, an dem RECQ4A entweder nicht beteiligt, oder in seiner Funktion ersetzbar ist.

Da hingegen die von uns publizierten Daten in der somatischen Entwicklung von *A. thaliana top3 α -1* auf eine Interaktion zwischen RECQ4A und TOP3 α hindeuten, stellte sich die Frage nach den somatischen Funktionen der hier untersuchten Gene.

3.5 RMI1 und TOP3 α in der somatischen HR und DNA-Reparatur

RMI1 und TOP3 α besitzen, wie in den vorhergegangenen Kapiteln gezeigt werden konnte, wahrscheinlich gemeinsame Funktionen in der meiotischen Rekombination, an denen RECQ4A nicht beteiligt ist. Nun sollte überprüft werden, inwieweit somatische Funktionen dieser drei Komponenten mit dem Modell eines konservierten RTR-Komplexes in DNA-Schadensreparatur und HR vereinbar sind.

3.5.1 Sensitivitäten der Mutanten gegenüber genotoxischen Agenzien

Für *RECQ4A* konnte eine Funktion bei der Reparatur sowohl MMS- als auch cis-Platin-induzierter DNA-Schäden nachgewiesen werden, die als RecQ-typisch anzusehen ist und erstaunlicherweise von dem nah verwandten Gen *RECQ4B* nicht geteilt wird.

Deshalb stellte sich die Frage, ob RMI1 und TOP3 α , die in der Meiose eine essentielle Rolle spielen und in anderen Organismen mit RecQ-Helikasen gemeinsam in einen konservierten RTR-Komplex involviert sind, in der somatischen DNA-Reparatur funktionell mit RECQ4A interagieren. Mit Hilfe von *top3 α -2* und der *rmi1-2*-Linie, die im Gegensatz zu *rmi1-1* aufgrund der nur teilweisen Sterilität homozygot kultivierbar ist, sollten Vergleiche zu *recq4A-1* unter Einfluss der oben genannten Mutagene angestellt werden. Dabei konnte für die Mutantenlinie *top3 α -2* durch ein Sortieren der Nachkommen heterozygoter Pflanzen die Verwendung homozygoter Individuen gewährleistet werden; letztere weisen somatische Schäden auf und besitzen bereits nach zweiwöchigem Wachstum auf Agarplatten einen charakteristischen Wuchsphänotyp in Form von auffällig kleinen Keimlingen mit eingerollten, dunkleren Blättern. Um durch linienspezifische Wachstumsunterschiede jedoch nicht die durch Mutagenbehandlung erhaltenen Effekte zu verfälschen, wurden die Daten jeweils prozentual auf die entsprechenden unbehandelten Proben bezogen. Zudem sollte durch eine auf gleiche Weise durchgeführte Behandlung mit Camptothecin überprüft werden, ob diese betreffenden Proteine auch während der normalen Replikation eine Rolle spielen.

3.5.1.1 MMS-Behandlung

Wie in Abbildung 31 gezeigt, sind Mutationen in *RMI1* und *TOP3 α* tatsächlich mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber MMS verbunden, die hier vergleichend mit *recq4A* anhand von fünf unabhängigen Datenreihen belegt wurde. Alle drei Proteine spielen also eine Rolle bei der Reparatur MMS-induzierter Schäden.

Bereits unter Einfluss von 60 ppm MMS unterscheiden sich alle drei Mutantenlinien signifikant von der Kontrolle, wobei sich der Effekt bei höheren Konzentrationen noch verstärkt. Während *rmi1-2* und *recq4A-1* etwa gleichstark durch MMS in ihrem Wachstum gehemmt werden, reagiert die Linie *top3 α -2* noch sensitiver auf das Mutagen. Allerdings könnten möglicherweise die bereits unter normalen Wachstumsbedingungen in dieser Linie auftretenden somatischen Schäden die höhere Empfindlichkeit erklären.

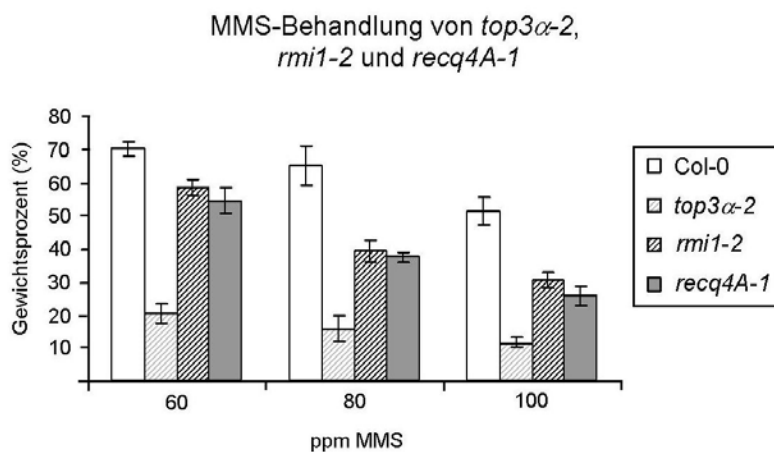


Abbildung 31: MMS-Behandlung von *top3 α -2* und *rmi1-2* im Vergleich mit *recq4A-1*

Gezeigt sind die Frischgewichte jeweils angegeben in Prozent bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Die Mutantenlinien *rmi1-2* und *top3 α -2* weisen wie auch *recq4A-1* deutliche Sensitivitäten auf. Alle drei Proteine spielen also eine Rolle bei der Reparatur MMS-induzierter Schäden. *Top3 α -2* reagiert noch stärker auf das Mutagen als die anderen Linien, allerdings ist diese Mutante schon in ihrem Wachstum unter Standardbedingungen auffällig.

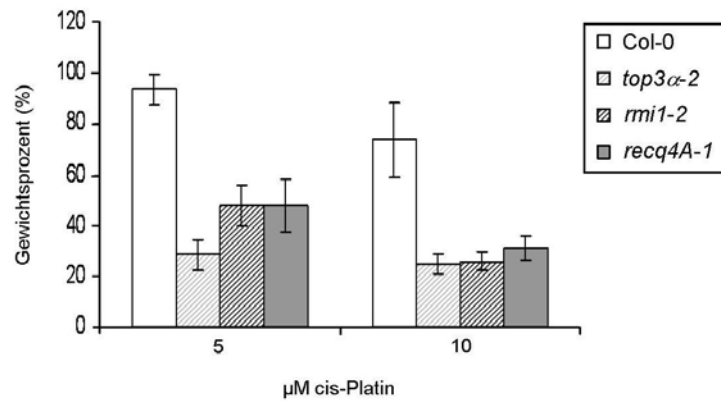
3.5.1.2 Cis-Platin-Behandlung

Neben MMS-induzierten Schäden erfordert auch die Reparatur der durch cis-Platin verursachten Querverknüpfungen der DNA-Basen die Funktion aller drei hier im Vergleich getesteten Komponenten, RECQ4A, RMI1 und TOP3 α . Bereits bei Behandlung mit 5 μ M cis-Platin unterscheiden sich alle drei Mutantenlinien in ihrem Wachstum signifikant vom Wildtyp, dieser Effekt wird bei 10 μ M noch stärker und zwischen den drei Mutantenlinien vergleichbarer. Abbildung 32 fasst die in vier bis acht unabhängigen Datenreihen erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Abbildung 32: Cis-Platin-Behandlung von *top3α-2* und *rmi1-2*

Gezeigt sind die Frischgewichte jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Auch Wildtyp und *recq4A-1* wurden zum Vergleich getestet. Neben *recq4A-1* weisen auch die anderen beiden Mutanten deutliche Sensitivitäten gegenüber dem Mutagen auf, woraus zu schließen ist, dass alle drei Proteine an der Reparatur cis-Platin-induzierter Schäden beteiligt sind.

Cis-Platin-Behandlung von *top3α-2*, *rmi1-2* und *recq4A-1*



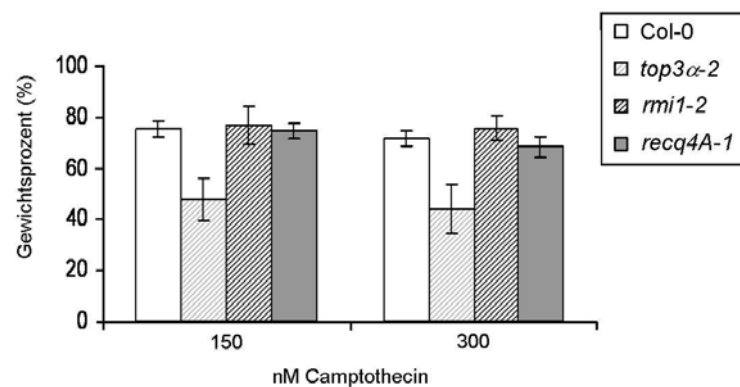
3.5.1.3 Camptothecin-Behandlung

Camptothecin ist ein pflanzliches Alkaloid, das spezifisch die eukaryotische Topoisomerase I hemmt. Durch Ausbildung eines stabilen Enzym-DNA-Komplexes wird die Replikation blockiert, wobei DNA-Brüche entstehen, an deren 3'-Enden die Topoisomerase kovalent gebunden bleibt (Hsiang *et al.*, 1985; Hsiang und Liu, 1988). Um zu untersuchen, ob die in einen möglichen RTR-Komplex bei Arabidopsis involvierten Proteine neben der Reparatur MMS- und cis-Platin-induzierter Schäden auch bei der normalen Replikation eine Rolle spielen, wurden die entsprechenden Mutantenlinien bezüglich ihres Wachstums unter dem Einfluss von Camptothecin untersucht.

Abbildung 33: Camptothecin-Behandlung von *top3α-2* und *rmi1-2*

Gezeigt sind die Frischgewichte jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Auch Wildtyp und *recq4A-1* wurden zum Vergleich getestet. Unter den hier untersuchten Mutanten *top3α-2*, *rmi1-2* und *recq4A-1* reagiert nur *top3α-2* deutlich sensitiv auf die Behandlung mit Camptothecin. Dementsprechend ist eine Funktion des Proteins in der normalen Replikation zu erwarten, die von RECQ4A und RMI1 unabhängig ist.

Camptothecin-Behandlung von *top3α-2*, *rmi1-2* und *recq4A-1*



Interessanterweise zeigt sich für die Mutante *top3α-2*, nicht aber für *rmi1-2* und *recq4A-1* eine deutliche Sensitivität verglichen mit dem Wildtyp (siehe Abbildung 33). Diese Typ IA-Topoisomerase muss also über die gemeinsamen Funktionen der drei Proteine hinaus zusätzliche Funktionen wahrnehmen, die nicht oder nicht notwendigerweise eine Aktivität der anderen beiden Proteine erfordern und die normalen Replikation betreffen.

3.5.2 Die Rolle von RMI1 und TOP3α in der somatischen HR

Eine Mutation von *RECQ4A* führt, wie in 3.1.2 gezeigt, zu dem für RecQ-Mutanten typischen Hyperrekombinations-Phänotyp. Dieser ist ebenfalls für *rmi1* und *top3α* in *A. thaliana* zu erwarten, falls diese in einen konservierten RTR-Komplex involviert sind, der übermäßige HR unterdrückt.

Tatsächlich ist die HR im Grundniveau in *rmi1-1* und *top3α-2* etwa gleich stark erhöht und ist mit den für *recq4A* erhaltenen Daten vergleichbar (siehe Abbildung 34 und Tabelle 5). Um zu prüfen ob dabei unterschiedliche Wege betroffen sind, oder alle Komponenten funktionell interagieren, wurden zunächst ebenfalls die Doppelmutanten *recq4A-1/top3α-2* und *recq4A-1/rmi1-1*, die gleichzeitig homozygot das IC9C-Konstrukt enthalten, durch Kreuzung und Selektion der gesuchten Genotypen generiert. Interessanterweise konnte so gezeigt werden, dass RECQ4A, TOP3α und RMI1 gemeinsame Funktionen in der Unterdrückung der HR besitzen und sich der Effekt der Hyperrekombination beim Ausschalten zweier Komponenten nicht weiter verstärkt. Bestätigt wird diese Auslegung der Daten dadurch, dass in allen getesteten Linien die HR durch BLE etwa gleich schwach induzierbar ist. Es ist also auch hier kein additiver Effekt der HR-Phänotypen zu beobachten. So erreichen die HR-Raten in allen hier dargestellten Einzel- und Doppelmutanten nach Behandlung mit 5 µg/ml BLE nur etwa das Niveau der IC9C-Kontrolle, wodurch sich in ähnlichem Maße erniedrigte Induktionsfaktoren ergeben. Die gemeinsame Funktion dieser Proteine betrifft folglich die Reparatur der Schäden, die während der Replikation auftreten, weniger hingegen klassische Doppelstrangbrüche, wie sie z.B. durch BLE verursacht werden.

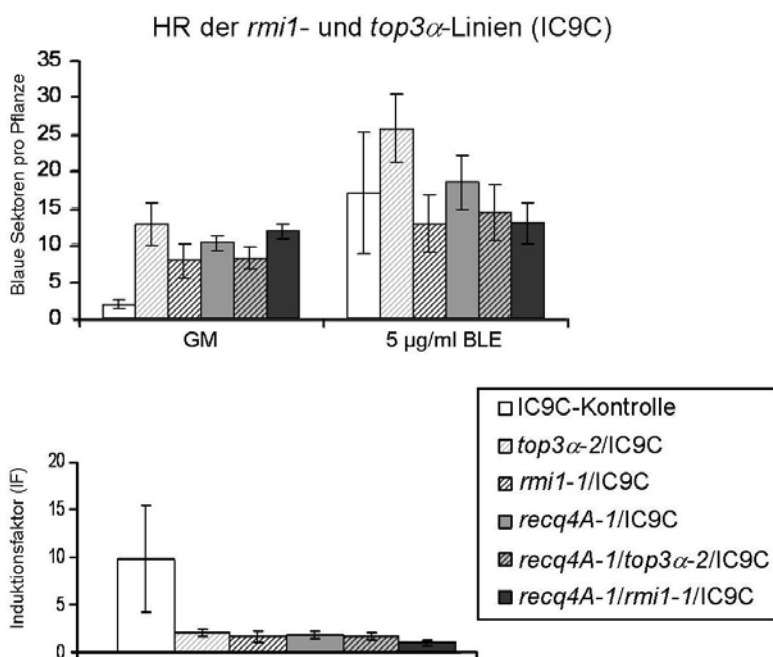


Abbildung 34: HR in *rmi1-1* und *top3α-2* im Vergleich mit *recq4A-1*

Wie bereits für die *recq4A*-Einzelmutante gezeigt, ist auch in *rmi1-1* und *top3α-2* das Grundniveau der HR vergleichbar stark erhöht. Dass auch in entsprechenden Doppelmutanten mit *recq4A-1* die HR-Rate nicht zusätzlich erhöht ist weist darauf hin, dass alle drei Proteine an einem gemeinsamen Weg der Unterdrückung übermäßiger HR beteiligt sind. Zudem ist in allen gezeigten Linien die Induzierbarkeit durch BLE im Vergleich zur IC9C-Kontrolle herabgesetzt. Bei Induktion zusätzlicher DSBs durch das Mutagen erreichen alle hier untersuchten Mutanten nur etwa das Niveau der Kontrolle und weisen somit einen niedrigeren Induktionsfaktor auf.

Tabelle 10: Daten zur HR in *top3 α -2*, *rmi1-1* und *recq4A-1* (IC9C)

Bleomycin-induzierte Proben der IC9C-Einzel- und Doppelmantanten wurden mit solchen verglichen, die reines Anzuchtmedium (GM) enthielten. Von jeweils mindestens fünf unabhängigen Versuchen wurde die Anzahl blauer Sektoren pro Pflanze gemittelt. Aus diesen Werten, sowie aus den jeweiligen Induktionsfaktoren pro Experiment und Linie (s.o.) wurden wiederum Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Linie/Mutante	GM	Stdw.	BLE	Stdw.	IF	Stdw.
IC9C-Kontrolle	1,82	0,52	16,98	8,23	9,76	5,61
<i>top3α-2</i> /IC9C	12,72	2,85	25,72	4,53	2,06	0,35
<i>rmi1-1</i> /IC9C	7,70	2,40	12,81	3,88	1,75	0,50
<i>recq4A-1</i> /IC9C	10,19	1,00	18,42	3,73	1,86	0,40
<i>recq4A-1/top3α-2</i> /IC9C	8,13	1,52	14,26	3,74	1,77	0,39
<i>recq4A-1/rmi1-1</i> /IC9C	11,72	1,06	12,87	2,84	1,14	0,29

3.5.3 Komplementation der Mutantenphänotypen von *rmi1* und *top3 α*

Aufgrund der Vollsterilität der Linie *rmi1-1* war nur die zweite Mutante bezüglich einer Funktion von RMI1 in der Reparatur MMS- und cis-Platin-induzierter Schäden untersucht worden. In Versuchen zur HR-Rate in den Mutanten war die Untersuchung von *rmi1-1* mit aufwändigen PCRs-Screenings verbunden (siehe 2.1.4). Von *TOP3 α* besitzen zwei unabhängige Mutantenlinien sehr unterschiedliche Phänotypen, die sich durch Sterilität und somatische Defekte (*top3 α -2*) gegenüber früher Letalität der Keimlinge (*top3 α -1*) auszeichnen.

Um deshalb die im Zuge dieser Arbeit erhaltenen Daten zu vervollständigen, wurden von Alexander Knoll Komplementations-Konstrukte kloniert (Knoll, 2007; unveröffentlichte Daten), mit Hilfe derer die Phänotypen der Mutantenlinien restauriert werden sollten. Parallel wurde in die *rmi1*-Linien jeweils ein cDNA-Konstrukt transformiert, sowie eines das das vollständige genomische *RMI1*-Gen repräsentiert. Für *TOP3 α* wurde nur ein Konstrukt eingesetzt, das das genomische Gen in voller Länge kodiert. Ziel war es in dieser Arbeit, die Konstrukte stabil in die Mutanten zu transformieren und Nachkommen zu isolieren, in denen die mit den Mutationen assoziierten Defekte behoben werden können.

Insgesamt wurden 34 erfolgreich transformierte Nachkommen der heterozygoten *rmi1*-Pflanzen durch Anzucht auf Gentamycin-haltigem Medium selektiert. Im PCR-Screening erwiesen sich darunter sieben als homozygote *rmi1-1*-Mutanten, diese entwickelten alle nach dem Umsetzen in Erde normale Schoten. Es kann also bestätigt werden, dass die Sterilität der *rmi1-1*-Mutante auf eben diese Mutation zurückzuführen ist und nicht etwa durch sekundäre, linienspezifische Effekte hervorgerufen wird.

In Zukunft wird zudem zu klären sein, ob auch die anderen in den *rmi1*-Linien beobachteten Defizite, wie Mutatgensensitivität und Hyperrekombination, durch Integration des vollständigen *RMI1*-Gens in

das Genom der Ackerschmalwand aufgehoben werden können. Zu diesem Zwecke wurden bereits insgesamt 27 positiv transformierte Nachkommen von *rml-2* selektiert, und zusätzlich IC9C-Kreuzungen beider Mutanten mit den Konstrukten transformiert. Die Selektion homozygoter Single-Copy und Single-Lokus-Linien und deren anschließende Charakterisierung ist also eines der nächsten Ziele in der Weiterführung dieses Projektes.

Teils durch Genotypisierung von Gentamycin-selektierten Pflanzen der ersten Nachkommengeneration nach der Transformation, teils durch Segregation der Nachkommen zunächst nur heterozygoter komplementierter Pflanzen, wurden Linien erhalten, in denen die Phänotypen der *top3 α* -Mutanten wieder aufgehoben wurden. Dabei konnten für *top3 α -1* vier, und für *top3 α -2* drei unabhängige Linien generiert werden, die normales Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigten und fertile Schoten entwickelten. Nur eine erfolgreich transformierte homozygote *top3 α -2*-Mutante entsprach in ihrem Phänotyp weiterhin dem der Ausgangslinie.

In der zweiten Generation nach Transformation wurde zudem eine Schotenuntersuchung durchgeführt. Dabei wurde der Wildtyp Col-0 mit Nachkommen der als homozygot genotypisierten, komplementierten Mutanten verglichen. Um zudem mögliche, allein durch die Transformation hervorgerufene Seiteneffekte auszuschließen, wurden ebenfalls solche Pflanzen mitgetestet, deren Elternpflanzen nach der Transformation und Gentamycin-Selektion bezüglich der *TOP3 α* -Mutationen dem Wildtyp entsprachen (siehe Abbildung 35).

Abbildung 35: Schoten der komplementierten *top3 α* -Pflanzen

Untersucht wurde die nächste Generation der erfolgreich transformierten Nachkommen heterozygoter *top3 α -1* und *-2*-Pflanzen. Dabei wurden jeweils solche verglichen, die nach der Transformation bezüglich der ursprünglichen Mutation als heterozygot, homozygot, oder dem Wildtyp entsprechend genotypisiert waren. Alle gezeigten Genotypen bildeten etwa vergleichbare Schoten aus, wodurch gezeigt werden konnte, dass durch Einbringen des intakten *TOP3 α* -Gens sowohl die Letalität von *top3 α -1*, als auch die Sterilität von *top3 α -2* aufgehoben werden kann.

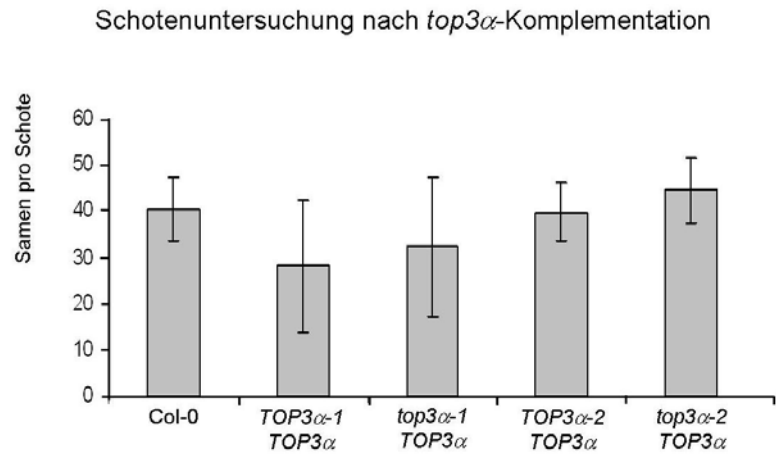


Um ungleichmäßiges Wachstum, das auf die Gentamycin-Behandlung zurückzuführen sein könnte, auszuschließen, wurde für eine statistische Schotenuntersuchung das Saatgut der zweiten Generation direkt in Erde ausgesät. Pflanzen, die das Komplementationskonstrukt nicht mehr tragen, sollten im Falle der *top3 α -1*-Mutation nicht, bzw. bei vorliegender *top3 α -2*-Mutation auffallend schlecht

wachsen. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 36 dargestellt und zeigen deutlich, dass die Phänotypen der Mutanten weitgehend aufgehoben werden konnten. Dementsprechend sind die beobachteten Defekte, die sich in den Linien *top3 α -1* und *-2* einerseits als Letalität und andererseits Sterilität äußern, jeweils tatsächlich auf das Fehlen eines intakten *TOP3 α* -Gens zurückzuführen.

Abbildung 36: Statistische Untersuchung der Schoten nach *top3 α* -Komplementation

In der zweiten Generation nach der Transformation wurden Nachkommen homozygoter Mutanten, sowie solcher Pflanzen, die bezüglich der jeweiligen *top3 α* -Mutation wieder homozygot dem Wildtyp entsprachen, mit Col-0 verglichen. Trotz relativ großer Schwankungen zwischen den einzelnen Pflanzen wird deutlich, dass sowohl die Letalität der *top3 α -1*-Linie als auch die mit einer *TOP3 α* -Mutation verbundene Sterilität durch das Einbringen des intakten Gens aufgehoben werden kann.



4 DISKUSSION

Die im Zuge dieser Doktorarbeit erhaltenen Ergebnisse führen zu drei bemerkenswerten Feststellungen: Erstens besteht zwischen den beiden sich stark ähnelnden RecQ-Genen von *A. thaliana*, *RECQ4A* und *4B*, ein deutlicher funktioneller Unterschied in der Beteiligung an DNA-Rekombination und –Schadensreparatur. Zweitens entspricht nicht nur die Funktion von *RECQ4A* dem, was nach bisherigen Informationen von Mensch und Hefe, für einen konservierten RTR-Komplex in *A. thaliana* zu erwarten wäre. Auch *RMI1* und *TOP3 α* führen bei Mutationen zu mit *req4A-1* vergleichbaren Defekten und lassen so auf eine tatsächlich konservierte, gemeinsame Funktion schließen. Passend zu diesen Ergebnissen ist die Doppelmutante *recq4A/mus81* in *A. thaliana*, wie auch für RecQ-Gene anderer Organismen gezeigt, letal. Dass diese Letalität sich durch Mutation des Frühen HR-Gens *RAD51C* aufheben lässt deutet darauf hin, dass die gemeinsame Funktion von *RECQ4A*, *RMI1* und *TOP3 α* einem *MUS81* einschließenden HR-Weg parallel geschaltet ist. Drittens konnte gezeigt werden, dass es für diese potenziellen RTR-Komponenten in Arabidopsis neben gemeinsamen Funktionen auch mindestens zwei weitere gibt, die jeweils nicht von beiden ihrer Partner geteilt werden. So sind einerseits *RMI1* und *TOP3 α* im Gegensatz zu *RECQ4A* essentiell für den korrekten Ablauf der Meiose. Andererseits ist *TOP3 α* auch in der mitotischen Teilung von grundlegender Bedeutung, eine Funktion die *RECQ4A* und *RMI1* nicht besitzen. Vor dem Hintergrund der in der Einleitung erläuterten Modelle zur Funktion der hier untersuchten Gene, sowie der aktuellen Literatur, sollen die gewonnenen Daten im Folgenden diskutiert werden.

4.1 Zwei ungleiche Partner eines duplizierten Genpaares

Beim Menschen sind Mutationen in drei der fünf dort kodierten RecQ-Gene mit schweren Erbkrankheiten und einer drastisch erhöhten Wahrscheinlichkeit, an Krebs zu erkranken, assoziiert. Letzteres ist auf die genomische Instabilität zurückzuführen, die aus dem Fehlen der jeweiligen RecQ-Funktion resultiert. Dies spiegelt sich auf zellulärer Ebene in verschiedenen Organismen durch einen charakteristischen Phänotyp wieder, der sich durch Hyperrekombination und Sensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien auszeichnet. Besonders gut untersucht wurden diesbezüglich vor allem *blm*-Zellen des Menschen und Mutanten des einzigen RecQ-Gens aus *S. cerevisiae*, *SGS1* (vergl. 1.1.2). Im Laufe der Evolution von einfachen Einzellern hin zu komplexen eukaryotischen Organismen fand auch innerhalb der RecQ-Genfamilie eine zahlenmäßige Zunahme statt, die sich in dem Auftreten mehrerer Homologe innerhalb eines Organismus äußert. Inwiefern dabei eine Spezialisierung auf bestimmte Funktionen stattfand, oder neue Funktionen hinzugewonnen wurden, ist weitgehend

ungeklärt. So war bisher nur sehr wenig bekannt über die Funktionen der RecQ-Gene höherer Pflanzen, von denen sieben im Genom von *A. thaliana* kodiert sind. Ein RecQ-typischer Phänotyp, in Form von Hyperrekombination und Sensitivität gegenüber der DNA-alkylierenden Substanz MMS, konnte 2004 für *recq4A* beschrieben werden (Bagherieh-Najjar, 2004). Zudem kann das durch seine die Helikasedomäne unterbrechende Insertion eher ungewöhnlich erscheinende *RECQsim*-Gen die MMS-Sensitivität von *sgs1*-Zellen der Bäckerhefe aufheben (Bagherieh-Najjar *et al.*, 2002). Interessanterweise sind in *Arabidopsis* aber zwei RecQ-Gene zu finden, die am ehesten Homologe von *BLM* oder *SGS1* darstellen, *RECQ4A* und *RECQ4B*. Diese entstanden durch ein Duplikationsereignis und wurden im Zuge der hier vorliegenden Arbeit näher charakterisiert.

Es konnte dabei gezeigt werden, dass zwei unabhängige Linien von *recq4A* neben einer MMS-Sensitivität (Bagherieh-Najjar, 2004) auch gegenüber cis-Platin deutliche Sensitivitäten im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, und demnach das intakte Protein in die Reparatur beider Schadenstypen involviert ist. Obwohl mehrfach untersucht, konnten bisher keine eindeutige Sensitivität einer *recq4A*-Linie gegenüber MMC nachgewiesen werden (Hartung *et al.*, 2007; Bagherieh-Najjar, 2004). MMC und cis-Platin sind beide sogenannte Crosslinker, die die Basen der DNA zwar untereinander verknüpfen, sich aber dennoch in der genauen Beschaffenheit der durch sie induzierten Schäden unterscheiden. Während MMC auch Kreuzverknüpfungen zwischen zwei Strängen induziert oder Addukte bildet, ist eine Behandlung mit cis-Platin eher mit solchen Basenverknüpfungen assoziiert, die benachbarte Guanin-Moleküle innerhalb eines Strangs betreffen (Übersicht in Grillari *et al.*, 2007). Die für *recq4A* beobachteten unterschiedlichen Reaktionen auf MMC- und cis-Platin-Behandlung lassen sich dadurch erklären, dass das RECQ4A-Protein in die Reparatur solcher Schäden involviert ist, die nur einen der beiden komplementären Stränge betreffen. Hingegen besitzt es keine essentielle Funktion bei der Auflösung von gleichzeitigen Blockierungen beider Stränge. Die Behebung von Replikations-Blockierungen über die durch das „Chickenfoot“-Modell beschriebenen Mechanismen liefert dafür eine plausible Erklärung. Durch Einwirkung des entsprechenden Crosslinkers kommt die Replikation zum Erliegen. An der Gabel wird im Anschluss die sogenannte „Chickenfoot“-Struktur ausgebildet, deren Auflösung vor allem dann eine exonukleolytische Spaltung erfordert, wenn der Schaden beide Stränge betrifft, so wie es vor allem nach Einwirkung von MMC der Fall ist. Hingegen ist diesem Modell zufolge eine nicht-exonukleolytische Spaltung dann möglich, wenn nur einer der parentalen Stränge affektiert ist (Übersicht in McGlynn und Lloyd, 2002). Für RecQ-Helikasen, speziell für das BLM-Protein, wurde eine solche „Branch Migration“-Funktion an entsprechenden Strukturen *in vitro* bereits nachgewiesen (Karow *et al.*, 2000), zudem sind Mutationen dieses Gens wie auch in dieser Arbeit für *recq4A* aus *A. thaliana* gezeigt, unter anderem mit Sensitivitäten gegenüber cis-Platin assoziiert (Übersicht in Grillari *et al.*, 2007). Alternativ könnte RECQ4A gemeinsam mit TOP3 α und RMI1 einen Dissolution-Prozess katalysieren (vergl. 1.2.1 und 1.2.3), und somit die Auflösung einer durch Rekombinationsreparatur zur dHJ umgesetzten „Chickenfoot“-Struktur

(Übersicht in Cobb und Bjergbaek, 2006). Diese Variante soll im nächsten Abschnitt anhand der HR-Daten, sowie in einem späteren Kapitel gemeinsam mit den somatischen, für *top3 α* und *rmi1* gewonnenen Ergebnissen diskutiert werden. RECQ4B ist dem RECQ4A-Protein sehr ähnlich, dennoch konnte in dieser Arbeit für zwei unabhängige Mutantenlinien keinerlei Sensitivität gegenüber MMS oder cis-Platin beobachtet werden. Dementsprechend ist RECQ4B nicht für die Reparatur solcher somatischer Schäden erforderlich, während innerhalb dieses duplizierten Genpaares RECQ4A bezüglich seines Spektrums an Schadenstypen, an deren Behebung es beteiligt ist, am ehesten funktionell dem BLM-Protein entspricht.

Eine für *blm* ebenfalls beschriebene Sensitivität gegenüber MMC (Pichierra *et al.*, 2004) widerspricht einer starken funktionellen Homologie des Gens zu *RECQ4A* aus *Arabidopsis* nicht zwangsläufig. Einerseits ist das Spektrum der durch MMC und cis-Platin induzierten Schäden überlappend; beide induzieren teilweise sowohl Intra- als auch Interstrangverknüpfungen, so dass für die Signifikanz eines solchen Nachweises auch die Sensitivität der jeweiligen Methode eine Rolle spielen mag. Andererseits sind die beschriebenen Modelle als Grenzfälle zu betrachten und in ihrer jeweiligen Ausführung *in vivo* feinen Unterschieden bezüglich der individuellen Substratspezifitäten unterworfen. Auch ist die Übernahme dieser von BLM wahrgenommenen Funktion der Behebung MMC-induzierter Schäden, die in RECQ4A nicht konserviert ist, durch eine andere RecQ-Helikase in *Arabidopsis* durchaus denkbar. Allerdings konnte bisher für keine der aktuell verfügbaren Mutantenlinien, speziell auch nicht für *recq4B* (Daten nicht gezeigt), eine Sensitivität gegenüber dieser Substanz nachgewiesen werden.

Um eine Rolle des duplizierten Genpaares, *RECQ4A* und *4B*, in der HR zu definieren, wurden Versuche mit Hilfe von Mutantenlinien durchgeführt, die homozygot das sogenannte IC9C-Konstrukt tragen. Dieses ermöglicht eine Quantifizierung von intermolekular verlaufenden HR-Ereignissen, die durch histochemische Färbung als blaue Sektoren auf den Pflanzen sichtbar gemacht werden (Molinier *et al.*, 2004). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist RECQ4B im Gegensatz zu 4A nicht an der Unterdrückung der HR beteiligt, wie sie für RECQ4A und andere RecQ-Helikasen wie BLM und SGS1 nachgewiesen wurde. Dementsprechend zeigen zwei unabhängige *recq4B*-Linien nicht den für *recq4A* publizierten (Bagherieh-Najjar, 2004), RecQ-typischen Phänotyp der Hyperrekombination. Das Protein ist dennoch an der HR beteiligt, verhält sich dabei aber erstaunlicherweise antagonistisch zu RECQ4A. Beide Mutantenlinien weisen mit stark erniedrigten HR-Frequenzen auf eine HR-fördernde Funktion des Proteins hin. Dieser Effekt ist unter den bisher für eukaryotische RecQ-Mutanten beschriebenen Phänotypen einzigartig (Hartung *et al.*, 2007). Dennoch wurde anhand des RECQ-Proteins aus *E. coli* neben der Auflösung aberranter HR-Intermediate bereits eine HR-fördernde Funktion diskutiert, die die Initiation der Rekombination betrifft (Magner *et al.*, 2007). Entsprechende Nachweise wurden *in vitro* durch die Umsetzung entsprechender Substrate erbracht (Harmon und Kowalczykowski, 1998). Auch in der Bäckerhefe steht der Unterdrückung der HR durch

SGS1, wie sie unter normalen Wachstumsbedingungen stattfindet, bei vermehrter DNA-Schädigung eine Induktion der HR gegenüber. So zeigen *sgs1*-Zellen den RecQ-typischen Hyperrekombinations-Phänotyp nur bei Anzucht ohne genotoxische Agenzien, während die HR-Rate die des Wildtyps nicht erreicht, wenn dem Anzuchtmedium beispielsweise MMS zugegeben wird (Onoda *et al.*, 2001).

Dass RecQ-Helikasen generell auch positive, HR-fördernde Funktionen übernehmen können, ist in Anbetracht aktueller Modelle also eigentlich nicht überraschend. Bemerkenswert ist allerdings, dass diese Funktion in eukaryotischen Systemen bisher nicht bewiesen werden konnte. Aufgrund der Spezialisierung von Mitgliedern der RecQ-Familie auf bestimmte Substrate und der Etablierung jeweils mehrerer Homologe in komplexeren Organismen ist dementsprechend damit zu rechnen, dass über ähnliche Befunde wie bei *A. thaliana* in naher Zukunft auch von anderen Modellorganismen berichtet wird.

4.2 RECQ4A und MUS81 in somatischen Zellen von Arabidopsis

Von den auf Sequenzebene dem BLM- und dem SGS1-Protein von Mensch bzw. Hefe beiden am ehesten homologen RecQ-Helikasen in Arabidopsis, RECQ4A und 4B, repräsentieren nur Mutanten von *RECQ4A* den dementsprechend zu erwartenden Phänotyp. Zu RECQ4A passt also das RecQ-Modell der Prozessierung von HR-Intermediaten, wie sie bei der Rekombinationsreparatur stehengebliebener Replikationsgabeln entstehen, in einer solchen Form dass daraus NCOs resultieren. Die evolutionär ebenfalls hochkonservierte Exonuklease MUS81 ist bei der Hefe an einem alternativen Weg der Auflösung von HR-Intermediaten beteiligt; diese Funktion wurde ebenfalls für Schäden vorausgesagt, wie sie an stehengebliebenen Replikationsgabeln auftreten (Whitby *et al.*, 2003). Auch im mammalischen System konnte gezeigt werden, dass MUS81 bei der Schadensbehebung an stehengebliebenen Replikationsgabeln, wie z.B. nach einer Blockierung durch MMC, eine Rolle spielt (Constantinou *et al.*, 2002; Hanada *et al.*, 2006). Doppelmutanten von *MUS81* und jeweils *SGS1* oder *RQH1* in *S. cerevisiae* bzw. *S. pombe* sind durch das Ausschalten der beiden parallelen Wege nicht lebensfähig (Boddy *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2001).

In *A. thaliana* konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine HR-Funktion von MUS81 nachgewiesen werden, allerdings betrifft diese nur Pflanzen, die durch die Behandlung mit Bleomycin besonderem genotoxischen Stress in Form von zusätzlichen Doppelstrangbrüchen ausgesetzt waren. Der vorliegenden Arbeit vorausgegangene Experimente mit MMC (Hartung *et al.*, 2006) bestätigen diesen Effekt und lassen insgesamt darauf schließen, dass das Protein erst dann im normalen Wachstum essentiell wird, wenn ein bestimmtes Maß an Schäden überschritten wird. Die Funktion des intakten Proteins, solche entstehenden HR-Intermediate in einen CO-Weg einzuschleusen, führt also in der Mutante zu einer Erniedrigung der detektierbaren HR-Ereignisse.

Eine mögliche Erklärung könnte eine Funktion von MUS81 im Falle der Überlastung des RAD1/RAD10-Weges sein, der im normalen Wachstum für die die Reinitiation stehengebliebener Replikationsgabeln durch Rekombinationsreparatur verantwortlich ist und auch in *A. thaliana* nachgewiesen wurde (Dubest *et al.*, 2002). Allerdings ist der für diesen Komplex vorgeschlagene Mechanismus nicht die Auflösung bereits entstandener Rekombinationsintermediate, sondern eine frühere Funktion: Durch den RAD1/RAD10-Komplex, der wie auch MUS81-EME1 zur Familie der XPF-Endonukleasen gehört, werden bereits nach der Stranginvasion nicht-homologe 3'-Überhänge entfernt (Vance und Wilson, 2002; Dubest *et al.*, 2002), eine Funktion die interessanterweise aktuell auch für MUS81 anhand der meiotischen Rekombination diskutiert wird (vergl. 4.4; Oh *et al.*, 2008). Dass die Funktionen von RAD1-RAD10 und MUS81-EME1 aber nicht hintereinander geschaltet sind, sondern tatsächlich zwei alternative Wege betreffen, ist deshalb wahrscheinlich, weil Doppelmutanten beider Komponenten in der Hefe stärker sensitiv gegenüber dem Topoisomerase I-Inhibitor Camptothecin sind, als die Einzelmutante *mus81* (Vance und Wilson, 2002). Dementsprechend wäre ein Modell denkbar, in dem MUS81 entweder ebenfalls diese frühe Funktion übernehmen kann und die Entscheidung zum CO bereits in diesem frühen Stadium, z.B. anhand der beteiligten Faktoren, getroffen wird. Oder MUS81 ist entsprechend dem DSBR-Modell nach Szostak an der dHJ-Auflösung zwar beteiligt, aber zusätzlich in solche frühen Schritte der HR-Initiation involviert (Szostak *et al.*, 1983).

Kann MUS81 diese Funktion bei vermehrter Schädigung nicht übernehmen, wie in den Mutantenlinien gezeigt, dient ein NCO-Weg, wie der RecQ-abhängige Weg in Hefe, als Ausweichmöglichkeit. Dementsprechend ist in *A. thaliana* die detektierte HR-Rate in *mus81-1* und *-2* nach Einwirkung von genotoxischem Stress niedriger im Vergleich zum Wildtyp.

Die für *recq4A* erhaltenen Daten zur Hyperrekombination passen in dieses Modell und lassen vermuten, dass das RECQ4A-Protein im normalen Wachstum an der Auflösung von HR-Intermediaten zum NCO beteiligt ist. Die in der Mutante im Verhältnis zum Wildtyp nicht weiter erhöhte HR nach Bleomycin-Induktion hatte zwar gezeigt, dass Doppelstrangbrüche mit zwei freien Enden nicht zu dem von RECQ4A prozessierten Spektrum an DNA-Schadenstypen zu zählen sind. Dennoch könnte eine RECQ4A-Funktion im Falle von vermehrter Schädigung an der Replikationsgabel durch eine Auflösung solcher Strukturen zum NCO die in *mus81* beobachtete erniedrigte HR-Rate unter genotoxischem Stress erklären. Dass hier neben MMC auch die HR-Induktion durch BLE betroffen ist und RECQ4A für die Reparatur solcher DSBs nicht essentiell ist, schließt nicht aus, dass das Protein hier in einen Backup-Mechanismus involviert ist, der im Falle der MUS81-Mutation greift.

Eine solche Funktionsaufteilung ließ der Theorie zufolge vermuten, dass entsprechend der in den Hefen dokumentierten Letalitäten auch in *A. thaliana* die Doppelmutante *mus81/recq4A* schwerwiegende somatische Defekte aufweist, falls nicht beispielsweise eine andere RecQ-Helikase die Funktion von RECQ4A übernehmen kann. Deshalb wurden Kreuzungen zwischen *mus81* und

diversen RecQ-Mutanten durchgeführt und doppelt homozygote Nachkommen selektiert. Tatsächlich wurde im Zuge dieser Arbeit die für die Hefen beschriebene Letalität auch für die *recq4A*-Doppelmutante mit *mus81* in Arabidopsis nachgewiesen. Sie äußert sich in kleinen Pflanzen, die in der Regel nach zwei- bis vierwöchiger Anzucht auf Agarplatten degenerieren (siehe 3.2.3). Dass sich die Letalität durch eine homozygote Mutation von *RAD51C* aufheben lässt zeigt, dass beide Gene erst dann essentiell sind, wenn die HR bereits initiiert wurde. Folglich müssen in *A. thaliana*, entsprechend dem an der Hefe entwickelten Modell, RECQ4A und MUS81 an zwei parallel geschalteten Wegen der Auflösung von HR-Intermediaten beteiligt sein.

Für die anderen in dieser Arbeit untersuchten *mus81/recq*-Doppelmutanten (mit *recq1*, 2, 4B, 5 und *WRNexo*) konnte im Gegensatz zu *recq4A* kein somatischer Defekt detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die hochkonservierte RecQ-Funktion, an stehengebliebenen Replikationsgabeln in einem MUS81 parallel geschalteten Weg HR-Intermediate zum NCO aufzulösen, ist in *A. thaliana* also auf RECQ4A beschränkt.

4.3 Ein konservierter RTR-Komplex in *A. thaliana*

Die konservierte RecQ-Funktion der Auflösung somatischer HR-Intermediate in einem MUS81 parallel geschalteten Weg erfordert z.B. in Mensch und Bäckerhefe, wie dort anhand der RecQ-Helikasen BLM und SGS1 gezeigt, zwei zusätzliche Faktoren. Diese sind eine Topoisomerase des Typs 1A (TOP3 bzw. TOP3 α), deren Interaktion mit SGS1 in der Bäckerhefe bereits 1994 beschrieben wurde (Gangloff *et al.*, 1994), sowie ein als RMI1 oder alternativ beim Menschen als BLAP75 bezeichnetes, DNA-bindendes Protein. Gemeinsam arbeiten diese Proteine im sogenannten RTR-Komplex („RECQ– TOP3 - RMI1“), dessen Zusammensetzung in dieser Form bei Mensch und Hefe direkt gezeigt wurde (Chang *et al.*, 2005; Übersicht in Mankouri und Hickson, 2007). In anderen Organismen weisen genetische Ansätze zur Interaktion von wenigstens zwei der drei Proteine auf eine vergleichbare Situation hin (Harmon *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004).

Die für *recq4A* erhaltenen Daten der Hyperrekombination, Sensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien und die Letalität der *mus81*-Doppelmutante stimmen vollständig mit dem Modell eines konservierten RTR-Komplexes in somatischen Zellen von *A. thaliana* überein. Deshalb wurden mögliche Interaktionspartner bezüglich ihrer somatischen Funktionen charakterisiert und in die Diskussion dieses Modells einbezogen, TOP3 α und RMI1. Besonders interessant ist diese Fragestellung auch deshalb, weil aufgrund der oftmals schwerwiegenden Phänotypen in höheren Eukaryoten bisher nur wenige Daten zu Mutationen von TOP3 α erhalten wurden, von *A. thaliana* aber eine lebensfähige Mutante existiert (Maftahi *et al.*, 1999; Plank *et al.*, 2005; Li und Wang, 1998).

Zwei Mutantenlinien von *TOP3 α* sind aus dem Bestand der SALK- und GABI-Kollektionen erhältlich, von denen eine, *top3 α -1*, passend zu den von anderen Eukaryoten beschriebenen *top3 α* -Mutanten schwere somatische Defekte aufweist. Diese äußern sich in einer Degeneration der Keimlinge auf Agarplatten oder in Erde innerhalb weniger Wochen nach Aussaat (vergl. 2.6.2; Hartung *et al.*, 2007). In der zweiten Linie hingegen, *top3 α -2*, ist das *TOP3 α* -Gen wahrscheinlich nicht vollständig ausgeschaltet, weshalb sie sich für die Charakterisierung der somatischen Funktionen des *TOP3 α* -Proteins in *A. thaliana* eignet.

Von *RMII* wurden ebenfalls zwei Linien aus der SALK-Kollektion erhalten, die sich im Schweregrad ihres Phänotyps unterscheiden. Bestand dieser Arbeit, und essentielle Voraussetzung für die weiteren funktionellen Untersuchungen, war zunächst die genaue Beschreibung der Insertions- bzw. Mutationsorte dieser beiden Mutanten, *rmi1-1* und *rmi1-2*. Während *rmi1-1* eine knapp 2 kb große Deletion in der genomischen Sequenz des *RMII*-Gens aufweist und deren Expression nach einer durch die Deletion verkürzten mRNA noch vor Ende des ORFs zu einem Abbruch kommt, liegt in *rmi1-2* eine doppelte T-DNA-Insertion mit jeweils zur genomischen Sequenz des *RMII*-Gens gerichteten LB-Sequenzen vor. Auch in letzterer Mutante findet nur eine Expression vor der Insertion statt; dementsprechend ist hier maximal die Bildung eines unvollständigen RMI1-Proteins zu erwarten, dass der Position der Insertion zufolge nur einen Bereich bis kurz vor dem Ende des fünften Exons einschließt. Die einzige von RMI1 im Menschen charakterisierte Proteinfunktion betrifft die DNA-Bindedomäne, die im Gen noch vor der Insertion der *rmi1-2*-Linie kodiert ist. Eine verbleibende Aktivität des so möglicherweise gebildeten, verkürzten Proteins ist dieser Charakterisierung der Insertionsorte zufolge also nicht auszuschließen.

Aufgrund der meiotischen Defekte, mit denen die Mutationen von *TOP3 α* und *RMII* assoziiert sind und in einem späteren Kapitel gesondert diskutiert werden sollen, ist bei beiden Faktoren die Konservierung von Funktionen in der DNA-Schadensreparatur und Rekombination zu erwarten, wie sie von anderen Organismen beschrieben wurde. Deshalb wurden die Linien *top3 α -2* und *rmi1-2* vergleichend einerseits mit dem Wildtyp, und andererseits mit der gegenüber beiden Agenzien sensitiven Linie *recq4A-1*, bezüglich ihres Wachstums in Anwesenheit von MMS und cis-Platin untersucht.

Wie durch signifikante Wachstumsunterschiede zum Wildtyp gezeigt werden konnte, sind beide Gene wichtig für die Reparatur der MMS-induzierten Alkylierungen, sowie der durch cis-Platin verursachten Vernüpfungen der Basen. Beide Schadenstypen können, wie eingangs erläutert, bei einem Zusammentreffen mit der Replikationsmaschinerie einen Neustart der Replikation durch Rekombinationsreparatur erfordern, wie durch das „Chickenfoot“-Modell vorausgesagt wird. Dieses gemeinsame Spektrum an DNA-Schadenstypen, für deren Reparatur *RECQ4A*, *TOP3 α* und *RMII* wichtig sind, lässt also eine gemeinsame, konservierte Funktion aller drei Komponenten vermuten. Ob

solche Funktionen in der normalen Replikation eine Rolle spielen, wurde mit Hilfe von Camptothecin untersucht, einem spezifischen Inhibitor der Topoisomerase I. Allerdings zeigte sich hier, dass *RECQ4A* und *RMI1* keine essentielle Beteiligung am Neustart der auf diese Weise blockierten Replikationsgabeln besitzen; Mutanten beider Gene reagieren nicht signifikant sensitiver auf diese Substanz als der Wildtyp. Hingegen zeigt sich in der Mutantenlinie *top3 α -2* nach Camptothecin-Einwirkung eine deutlich stärkere prozentuale Abnahme des Frischgewichts, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Es kann also zusammengefasst werden, dass alle drei untersuchten Gene die Reparatur eines gewissen Schadenspektrums gemeinsam wahrnehmen oder wenigstens an den gleichen Wegen beteiligt sind. Andererseits besitzt *TOP3 α* zusätzliche somatische Funktionen während der Replikation, die von *RECQ4A* und *RMI1* unabhängig sind. Diese können möglicherweise den schweren somatischen Defekt der Mutanten erklären, der sich in einer detektierbaren Zunahme von Mitosedefekten (*top3 α -2*) bis hin zu Letalität (*top3 α -1*) äußert (Hartung *et al.*, 2007; Hartung *et al.*, 2008, im Review-Prozess). Denkbar ist beispielsweise, dass das intakte *TOP3 α* -Protein Funktionen der Topoisomerase I übernehmen kann, wie es im Falle der Hemmung durch Camptothecin erforderlich wird.

Ob *TOP3 α* und *RMI1* gemeinsam mit *RECQ4A* an der Unterdrückung von CO-Ereignissen während der somatischen HR beteiligt sind, sollte anhand von Kreuzungen der Mutantenlinien mit der IC9C-Assaylinie untersucht werden. Diese ermöglicht die Quantifizierung somatischer interchromosomaler HR, wobei im Gegensatz zum 651-Konstrukt sowohl COs als auch Konversionsereignisse zu einer Restaurierung des Markers β -Glucuronidase führen können, und schließlich histochemisch nachgewiesen werden (Molinier *et al.*, 2004). Wie *recq4A-1* zeigen beide untersuchten Linien, *top3 α -2* und *rmi1-1* erhöhte HR-Raten bei Anzucht in normalem Wachstumsmedium. Dass dabei jeweils der gleiche Weg beteiligt ist, wird zusätzlich dadurch belegt, dass in den Doppelmutanten *recq4A/top2A-2* und *recq4A/rmi1-1* ebenso ein vergleichbar erhöhtes Grundniveau der HR erreicht wird. Bei einer Beteiligung der drei Komponenten an nicht parallel geschalteten, ähnlichen Wegen der HR, hätte man hingegen einen additiven Effekt bezüglich der Hyperrekombinations-Phänotypen der Einzelmutanten erwartet. Dass eine Mutation des entsprechenden *RMI1*-Homologs allein zu dem für RecQ-Mutanten beschriebenen Phänotyp erhöhter HR-Rate führt, wurde auch in der Bäckerhefe (Chang *et al.*, 2005) und in menschlichen Zellen gezeigt. Obwohl die OB-Falte als DNA-Bindende Domäne die einzige bisher identifizierte Proteinfunktion in *RMI1* darstellt, führt auch beim Menschen, analog zu *blm*-Zellen, eine Mutation zu einer erhöhten Rate an Sequenzaustauschen zwischen Schwesterchromatiden. Dabei ist *RMI1* *in vivo* essentiell für die Stabilität des Komplexes (Yin *et al.*, 2005).

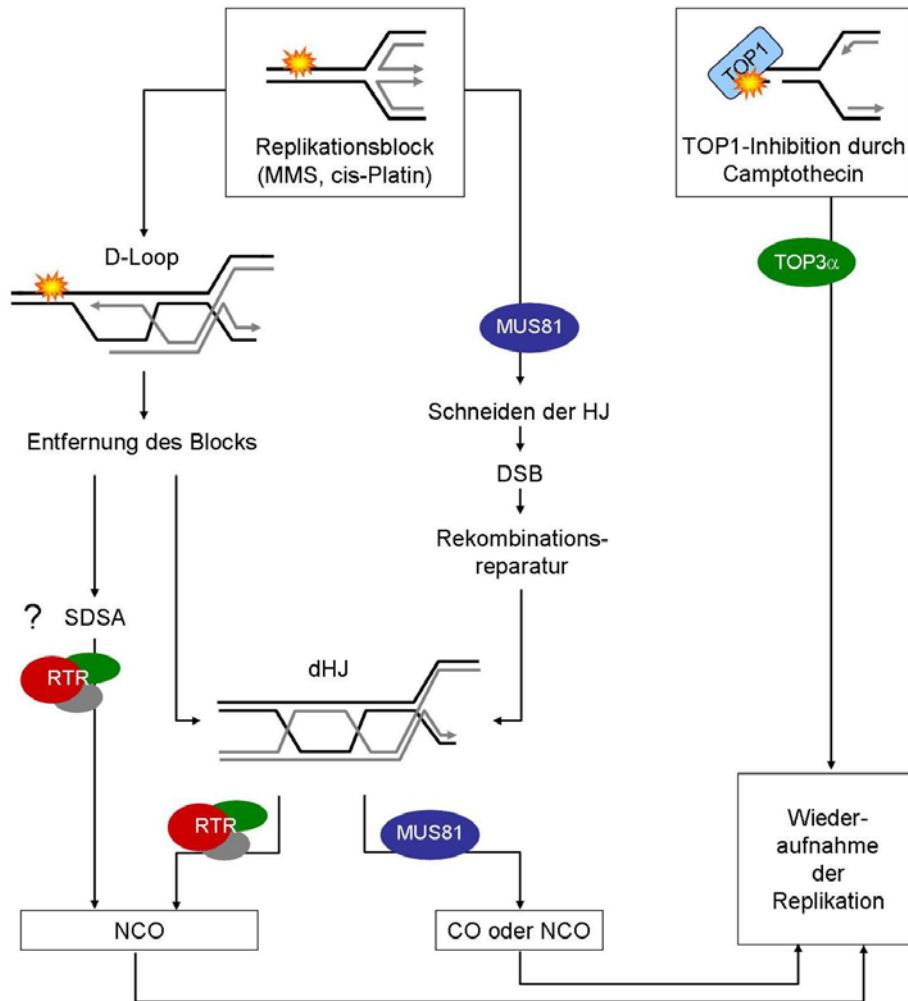


Abbildung 37: RECQ4A, TOP3 α , RMI1 und MUS81 an angehaltenen Replikationsgabeln

Den erhaltenen Daten zufolge werden in *A. thaliana* durch einen aus RECQ4A, RMI1 und TOP3 α bestehenden RTR-Komplex in einem MUS81 parallel geschalteten Weg HR-Intermediate auflöst. Schäden, die diese Funktionen erfordern sind z.B. durch MMS- oder cis-Platin-Einwirkung blockierte Replikationsgabeln. Welche Art von DNA-Strukturen dabei direkt umgesetzt werden, ist noch unklar. Vereinbar sind die aktuellen Ergebnisse damit, dass der RTR-Komplex entweder nach Ausbildung einer dHJ über den als „Dissolution“ bezeichneten Prozess NCO-Produkte erzeugt, oder schon den D-Loop prozessiert, wie für den SDSA-Weg beschrieben. Ebenso könnte MUS81 theoretisch ausgehend von der dHJ sowohl COs als auch NCOs produzieren, muss aber den erhaltenen Rekombinationsdaten zufolge eher eine CO-fördernde Funktion besitzen. Dies ist mit den aktuellen Modellen der meiotischen HR der Hefe vereinbar. Zudem ist denkbar, dass MUS81 direkt die an der blockierten Replikationsgabel ausgebildete „Chickenfoot“-Struktur prozessiert, bevor die Wiederaufnahme der Replikation ebenfalls über Rekombinationsreparatur ermöglicht wird (vergl. 1.2.1). Camptothecin verursacht eine Blockierung der Replikation in der Form, dass die Topoisomerase I stabil an die Gabel gebunden wird. Die Behebung solcher Schäden erfordert TOP3 α , nicht aber RECQ4A und RMI1.

Der in *recq4A-1* beobachtete Effekt der schlechteren Induzierbarkeit der HR durch Bleomycin-Behandlung wird in den Einzel- und *recq4A*-Doppelmutanten von *RMI1*- und *TOP3 α* reproduziert. Also betrifft diese gemeinsame Funktion der untersuchten Gene Schäden, die während des normalen Wachstums an der Replikationsgabel auftreten. Nicht essentiell sind sie hingegen für die Reparatur

klassischer Doppelstrangbrüche mit zwei freien Enden, wie sie in dieser Arbeit durch Bleomycin-Behandlung verursacht wurden.

Es kann also für somatische Zellen von *A. thaliana* zusammengefasst werden, dass RECQ4A, RMI1 und TOP3A gemeinsame Funktionen bei der Reparatur stehengebliebener Replikationsgabeln besitzen, die sie wahrscheinlich in einem konservierten RTR-Komplex wahrnehmen. Diese betreffen einen NCO-Weg der HR, der dem CO-fördernden, MUS81 einschließenden Weg parallel geschaltet ist. Allerdings ist TOP3A auch in Funktionen involviert, die RECQ4A und RMI1 im Gegensatz zu der gemeinsamen HR-Funktion nicht betreffen. Für RECQ4B hingegen ist der Wirkungsmechanismus noch unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Protein somatische HR fördert, ein Ergebnis das bisher noch nie für eukaryotische RecQ-Homologe erbracht wurde. Abbildung 37 fasst diese somatischen Funktionen, die für die genannten Faktoren nach den Ergebnissen dieser Arbeit zu erwarten sind, schematisch zusammen.

4.4 Meiotische Funktionen der potenziellen RTR-Gene in *A. thaliana*

Ob der konservierte RTR-Komplex generell auch eine Rolle in der meiotischen Rekombination spielt, ist umstritten. Es gibt Beispiele für meiotische Funktionen von TOP3 α - und RMI1-Proteinen und auch von RecQ-Helikasen. Ob diese aber einen Mechanismus betreffen, der mit dem der somatischen HR-Unterdrückung vergleichbar ist, ist aktueller Literatur zufolge noch unklar.

RecQ-Mutationen wurden mehrfach mit meiotischen Funktionen in Verbindung gebracht. Hinweise darauf liefert z.B. die *sgs1*-Zellen der Bäckerhefe beschriebenen reduzierten Lebensfähigkeit der Sporen, oder der Sterilität, von der typischerweise Patienten des Bloom-Syndroms betroffen sind (Watt *et al.*, 1995 und 1996; German, 1969). Für SGS1 wurde inzwischen tatsächlich, analog zu dem somatischen Hyperrekombinations-Phänotyp, auch eine CO-unterdrückende meiotische Funktion beschrieben (Jessop *et al.*, 2006). Passend zu dem Modell eines meiotischen RTR-Komplexes zeigen in der Bäckerhefe auch *top3*-Zellen meiotische Defekte, und beim Menschen konnte in meiotischen Zellen bereits eine direkte Interaktion zwischen dem BLM-Protein und TOP3 α nachgewiesen werden (Johnson *et al.*, 2000).

Für *A. thaliana* wurden in dieser Arbeit einerseits mögliche meiotische Funktionen von RMI1 und RECQ4A untersucht und mit den für *top3 α -2* beschriebenen Daten (Wurz-Wildersinn, 2007) verglichen werden. Andererseits sollte im Zusammenhang mit den hier beschriebenen somatischen HR-Funktionen eine Einordnung in den Gesamtkontext der DNA-Rekombination stattfinden.

Bei Anzucht in Erde zeigte sich in *rmi1-2* eine partielle, in *rmi1-1* eine vollständige Sterilität, deren Ursache sowohl in der gestörten Entwicklung des männlichen (Pollen) als auch des weiblichen (Eiapparat) Gametophyten begründet ist. Dabei steht die in *rmi1-2* beobachtete partielle Sterilität mit dem T-DNA-Insertionsort in Verbindung, der im Falle dieser Linie erst hinter der einzigen für RMI1 allgemein identifizierten Proteinfunktion liegt, nämlich der DNA-Bindedomäne. In Antheren dieser Linie konnte eine erniedrigte Rate lebensfähiger Pollen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden, zudem war die Samenproduktion um etwa die Hälfte reduziert.

Durch die Analyse der Meiosestadien in der Pollenentwicklung mittels DAPI-Präparation und Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die in *rmi1-1* vorliegende ca. 2 kb große Deletion im *RMI1*-Gen zu einem Abbruch der Meiose in Telophase I führt. Dem geht eine starke Fragmentierung voraus, die vor allem in Anaphase I deutlich wird. Dass dieser Phänotyp tatsächlich auf die *RMI1*-Mutation zurückzuführen ist, konnte zweifach bestätigt werden: Erstens lässt sich die Sterilität durch Transformation der heterozygoten Pflanzen mit dem intakten *RMI1*-Gen und anschließende Selektion *rmi1-1*-homozygoter, transformierter Nachkommen beheben. Zweitens zeigen auch Pflanzen der zweiten *rmi1*-Linie, neben normal erscheinenden Meiosestadien, die charakteristischen, für *rmi1-1* gezeigten Defekte (Daten nicht gezeigt). Diese ähneln stark dem Phänotyp der *top3α-2*-Linie und lassen somit darauf schließen, dass beide Proteine eine gemeinsame, essentielle meiotische Funktion besitzen.

Im Gegensatz zu *RMI1* und *TOP3α* wurde für Mutanten des *RECQ4A*-Gens kein Defekt in der meiotischen Teilung detektiert. Die Samenmenge ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert, und in DAPI-Präparationen der Meiosestadien während der Pollenentwicklung sind keine vermehrten Defekte zu verzeichnen. Somit muss, trotz der gemeinsamen somatischen Funktionen der drei Proteine, in der Meiose von *A. thaliana* die Zusammensetzung des Komplexes eine andere sein.

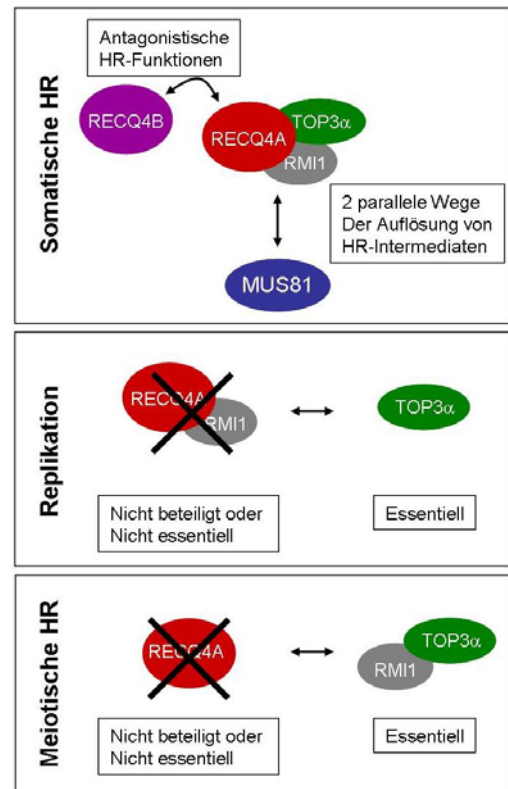


Abbildung 38: Zusammenfassung der Funktionen der untersuchten Gene

In der somatischen HR entsprechen die für RECQ4A, RMI1 und TOP3α erhaltenen Daten den Erwartungen eines konservierten RTR-Komplexes, der MUS81 parallel geschaltet ist. RECQ4B hingegen besitzt eine HR-fördernde, RECQ4A gegenüber antagonistische Funktion. TOP3α ist ebenfalls essentiell für die normale Replikation, wie durch Behandlung mit dem TOP1-Inhibitor Camptothecin nachgewiesen wurde. In der Meiose sind TOP3α und RMI1 von grundlegender Bedeutung, nicht aber ihr somatischer Interaktions-partner RECQ4A.

Abbildung 38 stellt diese gemeinsamen meiotischen Funktionen von RMI1 und TOP3 α den somatischen Funktionen gegenüber, die gemeinsam mit RECQ4A oder allein durch TOP3 α wahrgenommen werden. In dieser Übersicht sind ebenfalls RECQ4B als antagonistischer Faktor und MUS81 als Komponente eines parallelen Weges der Auflösung von HR-Intermediaten berücksichtigt.

Dass RECQ4A nicht oder nicht essentiell mit der meiotischen Funktion von TOP3 α und RMI1 in Verbindung steht, wirft die Frage auf, ob das Protein hier durch eine andere RecQ-Helikase ersetzt wird. Sieben RecQ-Gene sind im Genom von *A. thaliana* kodiert, deren evolutionäre Etablierung innerhalb eines Organismus die Spezialisierung der einzelnen Helikasen auf verschiedene Prozesse vermuten lässt. Dennoch weist keine unter den bisher untersuchten Mutanten dieser Gene, auch nicht von dem im Zuge eines Duplikationsereignisses gemeinsam mit *RECQ4A* entstandenen *RECQ4B*, detektierbare Fertilitätsdefekte auf.

Ob die gemeinsame meiotische Funktion von RMI1 und TOP3 α überhaupt die Aktion einer RecQ-Helikase erfordert, ist unklar. Falls ja, könnte dies dadurch zu erklären sein, dass unter den RecQ-Homologen von *A. thaliana* mehrere existieren, die sich gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können. Interessant wird es diesbezüglich in Zukunft sein, mit Hilfe spezieller Assaysysteme die meiotischen Rekombinationsraten in den verschiedenen RecQ-Einzelmutanten zu untersuchen. Analog zu den in *recq4A* und *4B* beobachteten antagonistischen Phänotypen, und damit verschiedenen Funktionen der Proteine in der somatischen HR, wären auch für mehrere parallel an der meiotischen Rekombination beteiligte RecQ-Proteine unterschiedliche Tendenzen bezüglich der Förderung von CO- oder NCO-Produkten zu erwarten. Auch die Erzeugung von Doppel- und Dreifachmutanten könnte über das Ausschalten der verfügbaren meiotischen Rekombinationswege zu sterilen Pflanzen führen. Jedoch zeigt sich bereits in der fertilen Linie *recq4A/recq4B*, dass diese beiden Gene, die im Fokus der vorliegenden Arbeit standen, nicht oder nicht allein in solche Funktion involviert sind (Daten nicht gezeigt).

Falls RMI1 und TOP3 α tatsächlich in einem mit ihrer somatischen Funktion vergleichbaren Mechanismus an der meiotischen Rekombination teilnehmen, stellt sich weiterhin die Frage, ob dieser Weg auch dort einem MUS81-abhängigen parallel geschaltet ist.

In den verschiedenen daraufhin untersuchten Organismen variiert die Notwendigkeit eines funktionellen MUS81-Endonuklease-Komplexes in der Meiose stark, so sind *MUS81*-Mutanten in der Spaltheife vollständig, hingegen in der Bäckerhefe nur partiell steril (Boddy *et al.*, 2001). In Säugern wurden bisher keine Fertilitätsdefekte durch Ausschalten dieses Gens detektiert (Dendouga *et al.*, 2005). In der Bäckerhefe wird ein Großteil der meiotischen CO-Produkte über den Interferenz-abhängigen MSH4/MSH5-Weg erzeugt, während MUS81 gemeinsam mit MMS4 an einem Interferenz-unabhängigen Unterweg der meiotischen Rekombination beteiligt ist (de los Santos *et al.*, 2001 und 2003). Eine vergleichbare Situation konnte inzwischen für die Wege der meiotischen

Rekombination in *A. thaliana* nachgewiesen werden; hier entstehen etwa 85 Prozent der meiotischen Chiasmata über den MSH4/MSH5-Wege, während die in der Mutante verbleibenden 15 Prozent Interferenz-unabhängig sind (Higgins *et al.*, 2004). Neben mitotischen Funktionen, wie sie in dieser Arbeit gezeigt, publiziert und durch andere Studien bestätigt wurden, deutet eine erhöhte Expression von MUS81 in den Antheren von Arabidopsis auf eine konservierte meiotische Funktion hin (Berchowitz *et al.*, 2007). Auch eine Kolokalisation mit dem frühen HR-Protein RAD51 konnte während der Meiose für MUS81 gezeigt werden, und die Zahl der Chiasmata ist in den Einzelmutanten tatsächlich reduziert (Higgins *et al.*, 2008). Dennoch zeigen Mutanten von MUS81 keine detektierbare Einschränkung bezüglich ihrer Fertilität (Hartung *et al.*, 2006), und durch die Charakterisierung der Doppelmutante *msh4/mus81* wurde erst kürzlich der Beweis dafür erbracht, dass tatsächlich ein dritter Weg der CO-Bildung in meiotischen Zellen von Arabidopsis existiert (Higgins *et al.*, 2008).

Über welchen genauen Mechanismus diese Funktion von MUS81 jedoch abläuft ist weiterhin unklar. So wurde für Hefe bereits vor einigen Jahren diskutiert (Übersicht in Hollingsworth und Brill, 2004), dass die Entscheidung zum CO oder NCO-Produkt bereits vor Ausbildung einer dHJ-Struktur fällt, und, wie in 1.2.3 zusammengefasst, meiotische NCO-Produkte eher über einen SDSA-Weg entstehen (Allers und Lichten, 2001). Obwohl das ursprüngliche DSBR-Modell für MUS81 eine Funktion der dHJ-Spaltung sowohl hin zum CO- als auch zum NCO-Produkt vorsieht, würden dem alternativen Modell der frühen CO/NCO-Entscheidung entsprechend nur noch CO-Produkte mit Hilfe von MUS81 entstehen. Interessanterweise wurde für die MUS81-Endonuklease erst kürzlich eine frühe meiotische Funktion nachgewiesen. Demnach ist MUS81, entweder zusätzlich oder alternativ zur Prozessierung von Holliday-Strukturen, bereits am Entfernen von nicht-homologen 3'-Überhängen während der Stranginvasion beteiligt (Oh *et al.*, 2008).

Es ist ungeklärt, ob wie in somatischen Zellen auch für die meiotische Rekombination ein fataler Defekt zu erwarten ist, wenn die HR bereits induziert und in einen bestimmten Weg gelenkt wurde, der eine RecQ-Helikase einschließt. Die Letalität in der somatischen Entwicklung der MUS81/RECQ4A-Doppelmutante erschwert die funktionelle Zuordnung der beiden Proteine. So wäre eine in Zukunft denkbare Strategie, in der lebensfähigen Dreifachmutante *mus81-1/recq4A-1/rad51C* unter einem meiosespezifischen Promotor *RAD51C* zu exprimieren. So wäre theoretisch ein rein meiotischer Phänotyp der somatisch letalen Doppelmutation charakterisierbar.

Über einen ähnlichen Ansatz wurde kürzlich die entsprechende Doppelmutante der Hefe, *mus81/sgs1*, mit Hilfe eines konditionellen Knockouts während der meiotischen Prophase untersucht; aus den erhaltenen Daten wurde ein Modell entwickelt, nach dem MUS81 und SGS1 gemeinsam an der Ausbildung korrekter, zwei Doppelstränge betreffender dHJs beteiligt sind. Hingegen verhindern sie die Ausbildung von rekombinanten Strukturen, die drei oder vier Doppelstränge einschließen und häufiger mit deletiöser Rekombination in Verbindung stehen (Oh *et al.*, 2007 und 2008). Werden

letztere dennoch gebildet, können sie normalerweise über den MSH4/MSH5-Weg aufgelöst werden, steht hingegen keiner dieser beiden Wege zur Verfügung, ist das entsprechend fatal (Oh *et al.*, 2008).

Dieses Modell der frühen HR-Funktionen von MUS81 und SGS1 in der Meiose kann einerseits eine Alternative zum klassischen Modell der Auflösung von dHJs darstellen, andererseits aber auch eine Ergänzung. So wird auch weiterhin eine Funktion von MUS81 bei der Auflösung der dHJs, allerdings eher zwischen Schwesterchromatiden als den homologen Chromosomen, während der Meiose diskutiert (Oh *et al.*, 2008). So stellt es eine Möglichkeit dar, ohne der konservativen „Dissolution“-Funktion von RecQ-Helikasen zu widersprechen, beobachtete Phänotypen auf eine andere Weise zu erklären. Die im Zuge dieser Arbeit erhaltenen Daten der Sterilität von *rmi1-1* und *top3 α -2* weisen darauf hin, dass auch in der meiotischen Teilung von *A. thaliana* eine Art konservierter RTR-Komplex existiert, der die Funktion einer bislang unbekanntenen Helikase einschließt. Die Tatsache, dass es im Gegensatz zu anderen Mutanten der Meiose im Falle von *top3 α -2* und *rmi1-1* sogar zu einem Abbruch der Meiose in Telophase I kommt, lässt vermuten dass dieser Komplex in der frühen Prophase in eine Art „Safeguarding“-Mechanismus involviert ist. Dabei löst er anscheinend aberrante DNA-Strukturen auf, die für die Chiasmata-Bildung nicht erforderlich sind und im Falle der Mutation von *TOP3 α* oder *RMII* in der späten meiotischen Prophase zu schwerwiegenden Problemen führen.

Für eine genaue mechanistische Einordnung dieser Funktionen in die aktuellen Modelle der meiotischen Rekombination sind allerdings weitere biochemische und genetische Ansätze erforderlich.

5 AUSBLICK

Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ergeben sich interessante neue Ziele in diesem Forschungsbereich, da einige Fragen weiterhin ungeklärt sind, und andere wiederum sich erst durch die neu gewonnenen Informationen stellen.

So kann für das durch Duplikation entstandene Genpaar *RECQ4A* und *4B* in *Arabidopsis* zwar gesagt werden, dass sich antagonistische Funktionen bezüglich der HR entwickelt haben, nicht aber worin diese auf molekularer Ebene begründet sind. Eine Möglichkeit, diese unterschiedlichen Funktionen zu erklären, besteht in der Komplementation der Mutanten mit Chimären-Konstrukten. Indem jeweils schwächer konservierte Bereiche beider Gene ausgetauscht werden, kann durch Beobachtung der Phänotypen solcher transformierter Pflanzen schließlich eine Aussage über funktionelle Eigenschaften dieser Regionen gemacht werden.

Zudem bietet der Befund, dass *RECQ4B* eine HR-fördernde Funktion besitzt, möglicherweise eine interessante biotechnologische Perspektive in der Erhöhung der Effizienz des Gene Targetings. Dieses ist in Pflanzen meist aufgrund der allgemein niedrigen Rate homologer Rekombination verglichen mit NHEJ bislang schwierig durchzuführen. Falls sich durch Überexpression von *RECQ4B* die HR-Rate steigern lässt, könnte sich dadurch die gezielte genetische Veränderung bestimmter genomischer Bereiche erreichen lassen, was durch die bisher ungerichtet verlaufende, durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation nicht möglich ist.

Eine wichtige offene Frage ist, nachdem in dieser Arbeit eine genetische Interaktion von *RECQ4A*, *TOP3 α* und *RMI1* nachgewiesen wurde, ob die Proteine direkt interagieren, wie es für die RTR-Komplexe von Mensch und Hefe gezeigt wurde. Hierzu bietet sich beispielsweise an, die Komplexpartner aus Pflanzengewebe nativ aufzureinigen und jeweils daran gebundene Faktoren zu analysieren.

Auch die Frage nach einer oder mehreren meiotisch wirksamen RecQ-Helikasen in *A. thaliana* ist noch ungeklärt. Neben fluoreszenzmikroskopischen Ansätzen wie der Antikörpermarkierung von entsprechenden RecQ-Proteinen in meiotischen Zellen bietet die Selektion von RecQ-Mehrfachmutanten einen vielversprechenden Ausblick. So wird sich in Zukunft klären lassen, ob neben der essentiellen meiotischen Funktion von *RMI1* und *TOP3 α* sich eventuell mehrere RecQ-Helikasen in der Beteiligung an einem meiotischen RTR-Komplex gegenseitig ersetzen können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die als Erhalter der genomischen Stabilität bezeichneten RecQ-Helikasen sind in den verschiedenen Organismen hochkonserviert und spielen dabei eine Rolle bei der Unterdrückung aberranter HR an durch DNA-Schädigung angehaltenen Replikationsgabeln. Unter den fünf RecQ-Genen des Menschen sind drei im Falle von Mutationen mit Erbkrankheiten assoziiert, denen eine drastisch erhöhte Rate der Entstehung verschiedener Formen von Krebs gemeinsam ist. Modelle zur Beschreibung der RecQ-Funktionen wurden vor allem anhand der einzigen in der Bäckerhefe vorhandenen RecQ-Helikase SGS1, sowie dem BLM-Protein entwickelt, dessen Mutation beim Menschen für das sogenannte Bloom-Syndrom verantwortlich ist.

Im Genom von *A. thaliana* existieren sieben RecQ-Gene, über deren Funktion bisher wenig bekannt ist. *RECQ4A* und *4B* sind unter ihnen von besonderem Interesse, weil sie bezüglich ihrer sich stark ähnelnden Sequenz beide am ehesten als Homologe von *BLM* und *SGS1* der Bäckerhefe anzusehen sind. Zudem wurde für *RECQ4A* bereits vor einigen Jahren gezeigt, dass entsprechende Mutanten den RecQ-typischen Phänotyp der Hyperrekombination und Sensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien repräsentieren. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, *RECQ4A* und *4B* funktionell zu analysieren und bezüglich einer konservierten Rolle in einem möglicherweise in *A. thaliana* konservierten RTR-Komplex zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollte zudem MUS81 als Komponente eines potenziellen alternativen HR-Weges, sowie TOP3 α und RMI1 als mögliche Komplexpartner dieser RecQ-Helikasen charakterisiert werden. Dabei galt es auch, zwischen meiotischer und somatischer HR zu unterscheiden.

Mit Hilfe von T-DNA-Insertionsmutanten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *RECQ4B* als erste bisher beschriebene eukaryotische RecQ-Helikase HR-fördernde Funktionen besitzt und im Gegensatz zu *RECQ4A* nicht an der Reparatur solcher Schäden beteiligt ist, wie sie ausgelöst durch Einwirkung von MMS und cis-Platin, unter anderem zu einer Blockierung der Replikation führen.

Hingegen ist *RECQ4A* tatsächlich in einen Weg der Auflösung von HR-Intermediaten involviert, der erstens die Funktionen von TOP3 α und RMI1 erfordert, und zweitens einer endonukleolytischen Spaltung durch MUS81 parallel geschaltet ist. Mutanten aller drei RTR-Komponenten weisen Sensitivität gegenüber dem gleichen Spektrum an DNA-Schadenstypen auf, und zeigen identische HR-Phänotypen. Für den korrekten Ablauf der meiotischen HR von *A. thaliana* sind RMI1 und TOP3 α ebenfalls erforderlich und dabei wahrscheinlich am gleichen Schritt beteiligt, während *RECQ4A* nicht oder nicht essentiell in diese Funktion involviert ist. Zudem besitzt TOP3 α Funktionen in der normalen Replikation, die sowohl von RMI1 als auch von *RECQ4A* unabhängig sind. Dementsprechend ist die Existenz eines konservierten RTR-Komplexes in *A. thaliana* wahrscheinlich, der in der somatischen HR *RECQ4A* einschließt, während seine Komposition in der meiotischen HR unbekannt ist. Die diesbezügliche Charakterisierung der anderen RecQ-Homologe von *A. thaliana*, der

direkte Nachweis der Interaktionen, sowie biochemische Studien zum Mechanismus der untersuchten Funktionen stellen dementsprechend interessante Ausblicke dar.

7 SUMMARY

RecQ helicases are evolutionary conserved and play important roles in the maintenance of genomic stability. Thereby they are involved in the suppression of aberrant recombination at replication forks that are stalled in response to DNA damage. Five RecQ genes are encoded in the human genome, and mutations in three of them are associated with severe hereditary diseases. Besides specific symptoms linked to these diseases, affected patients typically share dramatically enhanced cancer predispositions. Models that describe common RecQ functions were mainly developed for SGS1, the only RecQ homologue of the budding yeast, and for the human BLM protein which is connected to the so-called Bloom's syndrome.

Though seven RecQ genes have been identified in the genome of *A. thaliana*, little is known about their distinct roles. Two of them, *RECQ4A* and *4B*, show a notably high homology concerning their DNA and amino acid sequences. They are of special interest, because both can be regarded as *SGS1* and *BLM* homologues. Interestingly, for *RECQ4A* a mutant phenotype has been published a few years ago, that reflects the RecQ-typical features of hyperrecombination and sensitivity towards genotoxic agents. Therefore one target of this study was the functional analysis of *RECQ4A* and *4B* with respect to a potential role in a conserved RTR complex that has previously been described for yeast and humans. Additionally, *MUS81* was characterized as a potential factor involved in an alternative HR pathway, and also *RMI1* and *TOP3 α* as potential interaction partners. In doing so, it was important to distinguish between somatic and meiotic HR.

Within this study a hyporecombination phenotype of two independent *RECQ4B* mutants could be described, which is thereby the first reported case of a eukaryotic RecQ homologue being positively involved in HR. Furthermore, *RECQ4B* is not involved in the repair of those DNA damage types that are processed by the *RECQ4A* protein.

In contrast to *RECQ4B*, *RECQ4A* actually plays a role in a pathway of HR that is working in parallel to an endonucleolytic cleavage of HR intermediates by *MUS81*, and suppresses the formation of CO products. As it could be shown by the same spectra of damage type sensitivities and identical HR phenotypes of the mutants, this *RECQ4A* pathway also implies the functions of *TOP3 α* and *RMI1*. In meiosis however, only these two latter factors are essential, while *RECQ4A* has no or no essential function in this step. For *TOP3 α* an additional function in replication could be shown, that does not imply both of the other factors.

In summary, these results strongly suggest the existence of a conserved somatic RTR complex that consists of *RECQ4A*, *TOP3 α* and *RMI1*, and suppresses aberrant recombination in somatic cells of *A. thaliana*. In contrast, it can not be said whether for the meiotic function of *TOP3 α* and *RMI1* also a helicase is needed, or if possibly two or more of the RecQ helicases can substitute for each other in this step.

8 LITERATUR

- Abe K, Osakabe K, Nakayama S, Endo M, Tagiri A, Todoriki S, Ichikawa H, Toki S (2005) Arabidopsis RAD51C gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. *Plant Physiol* **139**: 896–908
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2105–2364
- Alexander, MP (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* **44**: 117–122
- Allers T, Lichten M (2001) Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* **106**: 47–57
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, *et al.* (2003) *Science* **301**:653–657
- Bachrati CZ, Borts R, Hickson ID (2006) Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* **34**: 2269–2279
- Bachrati CZ, Hickson ID (2003) RecQ helicases: Suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J* **374**: 577–606
- Bagherieh-Najjar MB (2004) DNA recombination in plants - Molecular and functional analysis of Arabidopsis. *Molecular Biology of Plants*, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute. University of Groningen, Haren, Dissertation
- Bagherieh-Najjar MB, de Vries OMH, Kroon JTH, Wright EL, Elborough KM, Hille J, Dijkwel PP (2003) Arabidopsis RecQsim, a plant-specific member of the RecQ helicase family, can suppress the MMS hypersensitivity of the yeast *sgs1* mutant. *Plant Mol Biol* **52**: 273–284
- Bennett RJ, Sharp JA, Wang JC (1998) Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 9644–9650
- Berchowitz LE, Francis KE, Bey AL, Copenhaver GP (2007) The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genet* **3**: e132
- Bergerat A, de Massy B, Gadelle D, Varoutas PC, Nicolas A, Forterre P (1997) An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**: 414–417
- Bergmann T (2004) Phänotypische Charakterisierung von RecQ-Helikase Mutanten in *Arabidopsis thaliana*. Botanik II, Universität Karlsruhe, Diplomarbeit
- Bernstein, DA, Keck, JL (2003) Domain mapping of *Escherichia coli* RecQ defines the roles of conserved N- and C-terminal regions in the RecQ family. *Nucleic Acids Res* **31**: 2778–2785
- Bjergbaek L, Cobb JA, Gasser SM (2002) RecQ helicases and genome stability: lessons from model organisms and human disease. *Swiss Med WKLY* **132**: 433–442
- Bleuyard JY, Gallego ME, White CI (2004) Meiotic defects in the Arabidopsis *rad50* mutant point to conservation of the MRX complex function in early stages of meiotic recombination. *Chromosoma* **113**: 197–203
- Bleuyard JY, White IC (2004) The Arabidopsis homologue of Xrcc3 plays an essential role in meiosis. *EMBO J* **23**: 439–449
- Boddy MN, Gaillard PH, McDonald WH, Shanahan P, Yates JR, Russel P (2001) Mus81-Eme1 are essential components of a holliday junction resolvase. *Cell* **107**: 537–548

- Boddy MN, Lopez-Girona A, Shanahan P, Interthal H, Heyer WD (2000) Damage tolerance protein mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase cds1. *Mol Cell Biol* **20**: 8758–8766
- Bonhomme S, Grelon M, Guerche P, Horlow C, Vezon D. Practical course on genetic and molecular analysis of Arabidopsis. *EMBO Course*, Module 1
- Boulikas T, Vougiouka M (2003) Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep* **10**: 1663–1682
- Britt A (2002) Repair of damaged bases. *The Arabidopsis Book*
- Brosh RM, Bohr VA (2007) Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. *Nucleic Acids Res* **35**: 7527–7544
- Brosh RM, Karow JK, White EJ, Shaw ND, Hickson ID, Bohr VA (2000) Potent inhibition of Werner and Bloom helicases by DNA minor groove binding drugs. *Nucleic Acids Res* **28**: 2420–2430
- Brosh RM, Waheed J, Sommers JA (2002) Biochemical characterization of the DNA substrate specificity of Werner syndrome helicase. *J Biol Chem* **277**: 23236–23245
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, Hays L, Morgan WF, Petrini JHJ (1998) The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: Linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**: 477–486
- Celerin M, Meino ST, Stone JE, Menzie AM, Zolan ME (2000) Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behaviour. *EMBO J* **19**: 2739–2750
- Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG (2003) Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep* **22**: 46–51
- Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**: 369–413
- Chang M, Bellaoui M, Zhang C, Desai R, Mozorov R, Delgado-Cruzata L, Rothstein R, Freyer GA, Boone C, Brown GW (2005) *RMII/NCE4*, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *EMBO J* **24**: 2024–2033
- Chen XB, Melchionna R, Denis CM, Gaillard PH, Blasina A, Van de Weyer I, Boddy NM, Russell P, Vailard J, McGowan CH (2001) Human MUS81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro. *Mol Cell* **8**: 1117–1127
- Choudhary S, Sommers JA, Brosh RM (2004) Biochemical and kinetic characterization of the DNA helicase and exonuclease activities of Werner syndrome protein. *J Biol Chem* **279**: 34603–34613
- Chu G (1997) Double strand break repair. *J Biol Chem* **272**: 24097–24100
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–43
- Cobb JA, Bjergbaek L (2006) RecQ helicases: lessons from model organisms. *Nucleic Acids Res* **34**: 4106–4114
- Connelly JC, Leach DRF (2002) Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11–Rad50 complex. *Trends Biochem Sci* **27**: 410–418
- Constantinou A, Chen XB, McGowan CH, West SC (2002) Holliday junction resolution in human cells: two junction endonucleases with distinct substrate specificities. *EMBO J* **21**: 5577–5585
- Constantinou A, Tarsounas M, Karow JK, Brosh RM, Bohr VA, Hickson ID, West SC (2000) Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep* **1**: 80–84

- Corbett KD, Berger JM (2004) Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**: 95-118
- Cromie GA, Hyppa RW, Smith GR (2008) The fission yeast homolog Rqh1 promotes meiotic recombination. *Genetics* **179**: 1157-1167
- De los Santos T, Hunter N, Lee C, Larkin B, Loidl J, Hollingsworth NM (2003) The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics* **164**: 81-94
- De los Santos T, Loidl J, Larkina B, Hollingsworth N M (2001) A role for MMS4 in the processing of recombination intermediates during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**: 1511-1525
- De Muyt A, Vezon D, Gendrot G, Gallois JL, Stevens R, Grelon M (2007) AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in *A. thaliana*. *EMBO J* **26**: 4126-4137
- De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH, Hartley JA (2000) Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **20**: 7980-7990
- Dendouga N, Gao H, Moechars D, Janicot M, Vialard J, McGowan CH (2005) Disruption of murine Mus81 increases genomic instability and DNA damage sensitivity but does not promote tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **25**: 7569-7579
- Dolganov GM, Maser RS, Novikov A, Tosto L, Chong S, Bressan DA, Petrini JH (1996) Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* **16**: 4832-4841
- Dou SX, Wang PY, Xu HQ, Xi XG (2004) The DNA binding properties of the *Escherichia coli* RecQ helicase. *J Biol Biochem* **279**: 6354-6363
- Dubest S, Gallego ME, White C (2002) Role of the AtRad1p endonuclease in homologous recombination in plants. *EMBO Rep* **3**: 1049-1054
- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J (1995) The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**: 655-666
- Enoch T, Carr AM, Nurse P (1992) Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Gen Dev* **6**: 2035-2046
- Fabre F, Chan A, Heyer WD, Gangloff S (2002) Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/ Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16887-16892
- Fortin GS, Symington LS (2002) Mutations in the yeast Rad51 that partially bypass the requirement for Rad55 and Rad57 in DNA repair by increasing the stability of Rad51-DNA complexes. *EMBO J* **21**: 3160-3170
- Gaillard PH, Noguchi E, Shanahan P, Russell P (2003) The endogenous MUS81-Eme1-complex resolves holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Mol Cell* **12**: 747-759
- Gangloff S, de Massy B, Arthur L, Rothstein R, Fabre F. (1999) The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. *EMBO J* **18**: 1701-1711
- Gangloff S, McDonald JP, Bendixen C, Arthur L, Rothstein R (1994) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* **14**: 8391-8398
- German J (1969) Bloom's Syndrome. I. Genetical and clinical observations in the first twenty-seven patients. *Am J Hum Genet* **21**: 196-227

- Geuting V (2008) Biochemische Charakterisierung der MUS81-EME1A- und MUS81-EME1B-Endonukleasekomplexe von *Arabidopsis thaliana*. Botanik II, Universität Karlsruhe, Doktorarbeit
- Gilbertson LA, Stahl FW (1996) A test of the Double-Strand Break Repair model for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**: 27-41
- Grelon M, Vezon D, Grendrot G, Pelletier G (2001) AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* **20**: 589-600
- Grillari J, Katinger H, Voglauer R (2007) Contributions of DNA interstrand cross-links to aging of cells and organisms. *Nucleic Acids Res* **35**: 7566–7576
- Guo RB, Rigolet P, Zagarian L, Fermandjian S, Xi XG (2005) Structural and functional characterizations reveal the importance of a zink binding domain in Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* **33**: 3109-3124
- Haber JE, Heyer WD (2001) The fuss about MUS81. *Cell* **107**: 551-554
- Hamant O, Ma H, Cande WZ (2006) Genetics of meiotic prophase I in plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 267-302
- Hanada K, Budzowska M, Davies SL, van Drunen E, Onizawa H, Beverloo HB, Maas A, Essers J, Hickson ID, Kanaar R (2006) The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1096-1104
- Hanai R, Caron PR, Wang JC (1996) Human TOP3: a single-copy gene encoding DNA topoisomerase III. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3653-3657
- Harmon FG, DiGate RJ, Kowalczykowski SC (1999) RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: A conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell* **3**: 611–620
- Harmon FG, Kowalczykowski SC (2001) Biochemical characterization of the DNA helicase activity of the *Escherichia coli* RecQ helicase. *J Biol Chem* **276**: 232–243
- Harmon FG, Kowalczykowski SC (1998) RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. *Gen Dev* **12**:1134-1144
- Hartung F, Angelis KJ, Meister A, Schubert I, Melzer M, Puchta H (2002) An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Curr Biol* **12**: 1787-1791
- Hartung F, Plchova H, Puchta H (2000) Molecular characterization of RecQ homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **28**: 4275-4282
- Hartung F, Puchta H (2000) Molecular characterization of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **28**: 1548-1554
- Hartung F, Puchta H (2001) Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. *Gene* **271**: 81-86
- Hartung F, Puchta H (2004) What comparative genomics tells us about the evolution of eukaryotic genes involved in recombination. *Curr Genom* **5**:109-121
- Hartung F, Puchta H (2006) The RecQ gene family in plants. *J Plant Physiol* **160**: 287-296
- Hartung F, Wurz-Wildersinn R, Fuchs J, Schubert I, Suer S, Puchta H (2007) The catalytically active tyrosine residues of both SPO11-1 and SPO11-2 are required for meiotic double-strand break induction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3090-3099
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol* **45**: 115-120
- Heyer WD (2004) Damage-signaling: RecQ sends an SOS to you. *Curr Biol* **14**: 895-897

- Higgins JD, Armstrong SJ, Franklin FCH, Jones GH (2004) The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in Arabidopsis. *Gen Dev* **18**: 2557–2570
- Higgins JD, Buckling EF, Franklin FCH, Jones GH (2008) Expression and functional analysis of AtMUS81 in Arabidopsis meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *Plant J* **54**: 152 - 162
- Hollingsworth NM, Brill SJ (2004) The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Gen Dev* **18**: 117–125
- Hope JC, Mense SM, Jalakas M, Mitumoto J, Freyer GA (2006) Rqh1 blocks recombination between sister chromatids during double strand break repair, independent of its helicase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 5875–5880
- Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **260**: 14873-14878
- Hsiang Y-H, Liu L F (1988) Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* **48**: 1722-1726
- Hu Y, Lu X, Barnes E, Yan M, Lou H, Luo G (2005) Recq15 and Blm RecQ DNA helicases have nonredundant roles in suppressing crossovers. *Mol Cell Biol* **25**: 3431–3442
- Hu Y, Raynard S, Sehorn MG, Lu X, Bussen W, Zheng L, Stark JM, Barnes EL, Chi P, Janscak P, Jasin M, Vogel H, Sung P, Luo G (2007) RECQL5/Recq15 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes Dev* **21**: 3073-3084
- Huppert JL, Balasubramanian S (2008) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* **35**: 406–413
- Hurta RA, Wright JA (1990) Amplification of the genes for both components of ribonucleotide reductase in hydroxyurea resistant mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **167**: 258-264
- Ira G, Malkova A, Liberi G, Foiani M, Haber J E (2003) Srs2 and Sgs1–Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* **115**: 401–411
- Jessop L, Rockmill B, Roeder GS, Lichten M (2006) Meiotic chromosome synapsis-promoting proteins antagonize the anti-crossover activity of Sgs1. *PLoS Genet* **2**: e155
- Johnson FB, Lombard DB, Neff NF, Mastrangelo MA, Dewolf W, Ellis NA, Marciniak RA, Yin Y, Jaenisch R, Guarente L (2000) Association of the Bloom Syndrome protein with topoisomerase III in somatic and meiotic cells. *Cancer Res* **60**: 1162-1167
- Johnson ME, Viaggiano L, Bailey JA, Abdul-Rauf M, Goodwin G, Rocchi M, Eichler EE (2001) Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes. *Nature* **413**: 514-519
- Johzuka K, Ogawa K (1995) Interaction of Mre11 and Rad50: Two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **139**: 1521–1532
- Kaliraman V, Mullen JR, Fricke WM, Bastin-Shanower SA, Brill S J (2001) Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes Dev* **15**: 2730-2740
- Kao YT, Saxena C, Wang L, Sancar A, Zhong D (2005) Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:16128–16132
- Karow JK, Constantinou A, Li JL, West SC, Hickson ID (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of Holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6504-6508
- Keeney S (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* **52**: 1-53
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double strand breaks are catalyzed by Spo11,

a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**: 375-384

Kiianitsa K, Solinger JA, Heyer WD (2006) Terminal association of Rad54 protein with the Rad51-dsDNA filament. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 9767-9772

Kim YC, Lee HM, Ryu SS, Kim JH, Koo HS (2002) Coaction of DNA topoisomerase III α and a RecQ homologue during the germ-line mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* **7**: 19 - 27

Kitao S, Shimamoto A, Goto M, Miller RW, Smithson WA, Lindor NM, Furuichi Y (1999) Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat Genet* **22**:82-84

Knippers R (2001) Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Knoll A (2007) Etablierung und Anwendung molekulargenetischer Methoden zur Charakterisierung von RecQ-Helikasen und ihren Interaktionspartnern in *Arabidopsis thaliana*. Botanik II, Universität Karlsruhe, Diplomarbeit

Kobbe D, Blanck S, Demand K, Focke M, Puchta H (2008) AtRECQ2, a RecQ-helicase homologue from *Arabidopsis thaliana*, is able to disrupt different recombinogenic DNA-structures in vitro. *Plant J* **55**: 397-405

Krejci L, Van Komen S, Li Y, Villemain J, Reddy MS, Klein H, Ellenberger T, Sung P (2003) DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature* **423**: 305-309

Kwan KY, Moens P B, Wang J C (2003) Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III beta. *PNAS* 100(5): 2526-2531

Kwan KY, Wang J C (2001) Mice lacking DNA topoisomerase III β develop to maturity but show a reduced mean lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5717-5721

Laibach F (1943) *Arabidopsis thaliana* (L) HEYNH, als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Bot Arch* **44**: 439455

Laursen LV, Ampatzidou E, Andersen AH, Murray JM (2003) Role for the fission yeast RecQ helicase in DNA repair in G2. *Mol Cell Biol* **23**: 3692-3705

Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**: 963-7

Lebel M, Leder P (1998) A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13097-13102

Li HQ, Li MR (2004) RecQ helicase enhances homologous recombination in plants. *FEBS Lett* **574**: 151-155

Li W, Kim SM, Lee J, Dunphy WG (2004) Absence of BLM leads to accumulation of chromosomal DNA breaks during both unperturbed and disrupted S phases. *J Cell Biol* **165**: 801-812

Li W, Wang JC (1998) Mammalian DNA topoisomerase IIIa is essential in early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1010-1013

Lieber MR, Karanjawala ZE (2004) Ageing, repetitive genomes and DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 69-75

Macris MA, Krejci L, Bussen W, Shimamoto A, Sunga P (2006) Biochemical characterization of the RECQ4 protein, mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *DNA Repair* **5**: 172-180

Maftahi M, Han CS, Langston LD, Hope JC, Zigouras N, Freyer GA (1999) The top3(+) gene is essential in *Schizosaccharomyces pombe* and the lethality associated with its loss is caused by Rad12 helicase activity. *Nucleic Acids Res* **27**: 4715-4724

Magner DB, Blankschien MD, Lee JA, Pennington JM, Lupski JR, Rosenberg SM (2007) RecQ promotes toxic recombination in cells lacking recombination intermediate-removal proteins. *Mol Cell* **26**: 273-286

- Mandell JG, Goodrich KJ, Bahler J, Cech TR (2005) Expression of a RecQ helicase homolog affects progression through crisis in fission yeast lacking telomerase. *J Biol Chem* **280**: 5249–57
- Mankouri HW, Hickson ID (2007) The RecQ helicase–topoisomerase III–Rmi1 complex: a DNA structure-specific ‘dissolvasome’? *Trends Biochem Sci* **32**: 538–546
- Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH (1997) hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **17**: 6087–6096
- McGlynn P, Lloyd RG (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 859–870
- McMahill MS, Sham CW, Bishop DK (2007) Synthesis-dependent strand annealing in meiosis. *PLoS Biol* **5**: 2598–2601
- Mercier R, Grelon M, Vezon D, Horlow C, Pelletier G (2001) How to characterize meiotic functions in plants? *Biochimie* **83**: 1023–1028
- Merker DJ, Dominska M, Petes TD (2003) Patterns of heteroduplex formation associated with the initiation of meiotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**: 47–63
- Mohaghegh P, Karow JK, Brosh Jr RM, Bohr VA, Hickson ID (2001) The Bloom’s and Werner’s syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res* **29**: 2843–2849
- Molinier J, Ries G, Bonhoeffler S, Hohn B (2004) Interchromatid and Interhomolog Recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 342–352
- Morozov V, Mushegian AR, Koonin E V, Bork P (1997) A putative nucleic acid-binding domain in Bloom's and Werner's syndrome helicases. *Trends Biochem Sci* **22**: 417–418
- Mullen JR, Kaliraman V, Ibrahim SS, Brill JS (2001) Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 103–118
- Mullen JR, Kaliramana V, Brill SJ (2000) Bipartite structure of the SGS1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 1101–1114
- Mullen JR, Nallaseth FS, Lan YQ, Slangle CE, Brill SJ (2005) Yeast Rmi1/Nce4 controls genome stability as a subunit of the Sgs1–Top3 complex. *Mol Cell Biol* **25**: 4476–4487
- Murray JM, Lindsay HD, Munday CA, Carr AM (1997) Role of *Schizosaccharomyces pombe* RecQ homolog, recombination, and checkpoint genes in UV damage tolerance. *Mol Cell Biol* **17**: 6868–6875
- Nakayama H, Nakayama K, Nakayama R, Irino N, Nakayama Y, Hanawalt PC (1984) Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of *Escherichia coli* K12: Identification of a new mutation (*recQ1*) that blocks the RecF recombination pathway. *Mol Gen Genet* **195**: 474–480
- Nassif N, Penney J, Pals S, Engels WR, Gloor GB (1994) Efficient copying of non-homologous sequences from ectopic sites via p-element induced gap repair. *Mol Cell Biol* **14**: 1613–1625
- Ng SW, Liu Y, Hasselblatt KT, Mok SC, Berkowitz RS (1999) A new human topoisomerase III that interacts with SGS1 protein. *Nucleic Acids Res* **27**: 993–1000
- Oh SD, Lao JP, Hwang PY, Taylor AF, Smith GR, Hunter N (2007) BLM ortholog, Sgs1, prevents aberrant crossing-over by suppressing formation of multichromatid joint molecules. *Cell* **130**: 259–272
- Oh SD, Lao JP, Taylor AF, Smith GR, Hunter N (2008) RecQ helicase, Sgs1, and XPF family endonuclease, Mus81–Mms4, resolve aberrant joint molecules during meiotic recombination. *Mol Cell Biol* **28**: 324–336
- Olsen Krogh B, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38**: 233–271

- Onoda F, Seki M, Miyajima A, Enomoto T (2001) Involvement of SGS1 in DNA damage-induced heteroallelic recombination that requires Rad51 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **264**: 702-708
- Opresko PL, Otterlei M, Graakjær J, Bruheim P, Dawut L, Kølvrå S, May A, Seidman MM, VA Bohr (2004) The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* **14**: 763-774
- Orren DK, Brosh RM, Nehlin JO, Machwe A, Gray MD, Bohr VA (1999) Enzymatic and DNA binding properties of purified WRN protein: high affinity binding to single-stranded DNA but not to DNA damage induced by 4NQO. *Nucleic Acids Res* **27**: 3557-3566
- Orren DK, Theodore S, Machwe A (2002) The Werner syndrome helicase/exonuclease (WRN) disrupts and degrades D-loops *in vitro*. *Biochemistry* **41**: 13483 -13488
- Paeschke K, Simonsson T, Postberg J, Rhodes D, Lipps HJ (2005) Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 847 - 854
- Pawlowski WP, Cande WZ (2005) Coordinating the evens of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol* **15**: 674-681
- Pichierri P, Franchitto, Rosselli F (2004) BLM and the FANC proteins collaborate in a common pathway in response to stalled replication forks. *EMBO J* **23**: 3154-3163
- Plank JL, Chu SH, Reineke Polhaus J, Wilson-Sali T, Hsieh TS (2005) *Drosophila melanogaster* topoisomerase III preferentially relaxes positively or negatively supercoiled bubble substrate and is essential during development. *J Biol Chem* **280**: 3564-3573
- Prang Q, Hays JB (1991) UV-B-inducible and temperature-sensitive photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers in *A. thaliana*. *Plant Physiol* **95**: 536-543
- Puchta H (1999) Doppelstrangbruchreparatur und Genomevolution bei Pflanzen. *Biospektrum* **2**: 105-108
- Puizina J, Siroky J, Mokros P, Schweizer D, Riha K (2004) Mre11 deficiency in *Arabidopsis* is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *Plant Cell* **16**: 1968-1978
- Rink SM, Lipman R, Alley SC, Hopkins PB, Tomasz M (1996) Bending of DNA by mitomycin c induced GpG intrastrand cross-link. *Chem Res Toxicol* **9**: 382-389
- Roberts J, White MF (2005) An archaeal endonuclease displays key properties of both eukaryal XPF-ERCC1 and MUS81. *J Biol Chem* **280**: 5924-5928
- Rosenthal G, Assa V, Monos T, Biedner B, Lifshitz T, Zirkin H, Finkelstein E, Lazarov A (1996) Werner's syndrome. *Br J Ophthalmol* **80**: 576-577
- Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat.) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**: 247-259
- Sancar A, Smith FW, Sancar G (1984) Purification of *Escherichia coli* DNA photolyase. *J Biol Chem* **259**: 6028-6032
- Schaefer DG (2001) Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr Op Plant Biol* **4**: 143-150
- Schwacha A, Kleckner N (1995) Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell* **83**: 783-791
- Sharma S, Doherty KM, Brosh RM (2006) Mechanisms of RecQ helicases in pathways of DNA metabolism and maintenance of genomic stability. *Biochem J* **15**: 319-337

- Sharma S, Sommers JA, Choudhary S, Faulkner, JA, Cui S, Andreoli L, Vindigni A, Brosh RM (2005) Biochemical analysis of the DNA unwinding and strand annealing activities catalyzed by human RECQ1. *J Biol Chem* **280**: 28072–28084
- Shen JC, Gray MD, Oshima J, Kamath-Loeb AS, Fry M, Loeb L A (1998) Werner syndrome protein. I. DNA helicase and DNA exonuclease reside on the same polypeptide. *J Biol Chem* **273**: 34139-34144
- Shen JC, Loeb LA (2000) The Werner's syndrome gene: the molecular basis of RecQ helicase-deficiency diseases. *Trends Genet* **16**: 213-220
- Shimamoto A, Nishikawa K, Kitao S, Furuichi Y (2000) Human RecQ5B, a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3 α and 3 β . *Nucleic Acids Res* **28**: 1647-1655
- Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* **69** : 457-470
- Siitonen HA, Kopra O, Kääriäinen H, Haravuori H, Winter RM, Säämänen AM, Peltonen L, Kestilä M (2003) Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL diseases. *Hum Mol Genet* **12**: 2837–2844
- Sinclair DA, Mills K, Guarente L (1997) Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast Sgs1 mutants. *Science* **277**: 1313-1316
- Smith GR, Boddy MN, Shanahan P, Russell P (2003) Fission yeast Mus81-Eme1 holliday junction resolvase is required for meiotic crossing over but not for gene conversion. *Genetics* **165**: 2289–2293
- Sonoda E, Takata M, Yamashita YM, Morrison C, Takeda S (2001) Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8388–8394
- Spurr AR (1969) A low viscosity resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruc Res* **26**: 31-43
- Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, Wada T, Maxwell A, Roberts K, Sugimoto-Shirasu K (2006) Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J* **48**: 206-216
- Stewart E, Chapman CR, Al-Khodairy F, Carr AM, Enoch T (1997) Rqh1⁺, a fission yeast gene related to the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for reversible S phase arrest. *EMBO J* **16**: 2682–2692
- Suer S (2005) Charakterisierung von DNA-Reparatur-Mutanten aus *Arabidopsis thaliana*. Botanik II, Universität Karlsruhe, Diplomarbeit
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K (2003) Big it up: Endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 544–553
- Sugimoto-Shirasu K, Stacey NJ, Corsar J, Roberts K, McCann MC (2002) DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **12**: 1782-1786
- Sugiyama T, Kantake N, Wu Y, Kowalczykowski SC (2006) Rad52-mediated DNA annealing after Rad51-mediated DNA strand exchange promotes second ssDNA capture. *EMBO J* **25**: 5539–5548
- Sugiyama T, Kowalczykowski SC (2002) Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem* **277**: 31663-31672
- Sugiyama T, New JH, Kowalczykowski, SC (1998) DNA annealing by Rad52 Protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6049-6054
- Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC (1997) A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem* **272**: 7940-7945

- Swoboda P, Gal S, Hohn B, Puchta H (1994) Intrachromosomal homologous recombination in whole plants *EMBO J* **13**: 484–489
- Symington LS (2005) Focus on recombination. *EMBO Rep* **6**: 512-517
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35
- Tamura K, Adachi Y, Chiba K, Oguchi K, Takahashi H (2002) Identification of KU70 and KU80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double strand breaks. *Plant J* **29**: 771-781
- Tercero JA, Diffley JF (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**: 553-557
- Thaler DS, Stahl FW (1998) DNA double-chain breaks in recombination of phage λ and of yeast. *Annu Rev Genet* **22**: 169-197
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *A. thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2007) Aktualisierte Internetseite. http://www.arabidopsis.org/portals/genAnnotation/gene_structural_annotation/agicomplete.jsp
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* **282**: 1945-2140
- Trujillo KM, Sung P (2001) DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50-Mre11 complex. *Biol Chem* **276**: 35458-35464
- Tuteja N, Singh MB, Misra MK, Bhalla PL, Tuteja R (2001) Molecular mechanisms of DNA damage and repair: Progress in plants. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**: 337–397
- Umezumi K, Nakayama K, Nakayama H (1990) *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5363-5367
- Usui T, Tsutomu O, Oshiumi H, Tomizawa JI, Ogawa H, Ogawa T (1998) Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* **95**: 705–716
- van Brabant AJ, Ye T, Sanz M, German JL, Ellis NA, Holloman WK (2000) Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase. *Biochemistry* **39**: 14617 -14625
- van Maldergem L, Siitonen HA, Jalkh N, Chouery E, De Roy M, Delague V, Muenke M, Jabs EW, Cai J, Wang L, Plon SE, Fourneau C, Kestilä M, Gillerot Y, Mégarbané A, Verloes A (2006) Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *J Med Genet* **43**: 148–152
- Vance JR, Wilson TE (2002) Yeast Tdp1 and Rad1-Rad10 function as redundant pathways for repairing Top1 replicative damage. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 13669-13674
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951
- Wang W, Seki M, Narita Y, Nakagawa T, Yoshimura A, Otsuki M, Kawabe YI, Tada S, Yagi H, Ishii T, Enomoto T (2003) Functional relation among RecQ11, RecQ15 and BLM in cell growth and sister chromatid exchange formation. *Mol Cell Biol* **23**: 3527-3535
- Watt PM, Hickson ID, Borts RH, Luis EJ (1996) SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**: 935-945

- Watt PM, Louis EJ, Borts RH, Hickson ID (1995) Sgs1: A eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II in vivo and is required for faithful chromosome segregation. *Cell* **81**: 253-260
- Weinstein J, Rothstein R (2008) The genetic consequences of ablating helicase activity and the Top3 interaction domain of Sgs1. *DNA Repair* **7**: 558-571
- Weterings E, Chen DJ (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* **18**: 114–124
- Whitby MC, Osman F, Dixon J (2003) Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4. *J Biol Chem* **278**: 6928–6935
- Wilson TM, Chen AD, Hsieh T (2000) Cloning and characterization of *Drosophila* topoisomerase IIIbeta. Relaxation of hypernegatively supercoiled DNA. *J Biol Chem* **275**: 1533-1540
- Wu L, Davies SL, North PS, Goulaouic H, Riou JF, Turley H, Gatter KC, Hickson ID (2000) The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J Biol Chem* **275**: 9636-9644
- Wurz-Wildersinn R (2007) Untersuchungen zur meiotischen Rekombination in *Arabidopsis thaliana*. Botanik II, Universität Karlsruhe, Doktorarbeit
- Yagamata K, Kato JI, Shimamoto A, Goto M, Furuichi Y, Ikeda H (1998) Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant: Implication for genomic instability in human diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8733-8738
- Yin J, Soback A, Xu C, Meetei AR, Hoatlin M, Li L, Wang W (2005) BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity. *EMBO J* **24**: 1465–1476
- Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* **272**: 258–262
- Zahler AM, Williamson JR, Cech TR, Prescott DM (1991) Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **350**: 718 - 720

ANHANG

Alle Werte sind ausgedrückt in Gewichtsprozent (Frischgewicht) der jeweils unbehandelten Kontrolle der entsprechenden Pflanzenlinie. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen zu den im Ergebnisteil präsentierten Versuchsreihen.

Mutagenbehandlung der *recq4A*- und *4B*-Linien

MMS	60 ppm	Stdw.	80 ppm	Stdw.	100 ppm	Stdw.
Col-0	63,1	7,7	39,5	9,1	30,9	7,9
<i>recq4A-1</i>	39,8	4,9	18,1	5,1	9,4	2,5
<i>recq4A-2</i>	41,9	8,2	18,1	5,2	8,8	2,7
<i>recq4B-1</i>	63,4	6,7	39,9	8,9	26,7	9,8
<i>recq4B-2</i>	61,4	5,0	41,3	9,8	25,7	9,0
<i>recq4A-1/4B-2</i>	42,8	12,3	19,6	10,4	9,9	4,0

Cis-Platin	5 µM	Stdw.	10 µM	Stdw.
Col-0	72,4	15,0	23,0	9,1
<i>recq4A-1</i>	15,0	3,6	9,7	2,8
<i>recq4A-2</i>	15,7	3,0	10,3	2,9
<i>recq4B-1</i>	71,1	17,1	29,2	12,1
<i>recq4B-2</i>	69,2	12,9	22,5	10,7
<i>recq4A-1/4B-2</i>	16,5	4,1	7,9	1,8

Mutagenbehandlung der *mus81*-Linien

Cis-Platin	5 µM	Stdw.	10 µM	Stdw.
Col-0	106,7	20,8	91,9	27,1
<i>mus81-1</i>	61,8	4,7	37,7	4,7
<i>mus81-2</i>	61,1	7,0	36,8	6,6

Mutagenbehandlung der *top3α*- und *rmi1*-Mutanten im Vergleich zu Col-0 und *recq4A-1*

MMS	60 ppm	Stdw.	80 ppm	Stdw.	100 ppm	Stdw.
Col-0	70,3	2,1	65,1	5,9	51,6	4,1
<i>top3α-2</i>	20,3	3,0	15,7	3,9	11,5	1,5
<i>rmi1-2</i>	58,43	2,5	39,2	3,4	30,3	2,3
<i>recq4A-1-1</i>	54,4	4,0	37,4	1,5	25,8	3,1

Cis-Platin	5 μ M	Stdw.	10 μ M	Stdw
Col-0	93,6	5,8	73,5	14,9
<i>top3α-2</i>	28,3	5,7	24,4	4,1
<i>rmi1-2</i>	47,8	8,0	25,7	3,7
<i>recq4A-1</i>	47,6	10,7	31,1	4,7

Camptothecin	150 nM	Stdw.	300 nM	Stdw.
Col-0	75,4	3,18	71,5	3,0
<i>top3α-2</i>	47,7	8,4	44,0	9,4
<i>rmi1-2</i>	76,8	7,2	75,6	5,0
<i>recq4A-1</i>	74,7	3,1	68,5	4,1

LEBENS LAUF

Stefanie Suer, geboren am 08.03.1980 in Ibbenbüren

Nationalität: deutsch

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule in Ibbenbüren
1990 – 1999	Johannes-Kepler-Gymnasium, Ibbenbüren
	Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

1999 – 2005	Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TH)
	Hauptfächer: Botanik und Mikrobiologie
	Nebenfächer: Biochemie und Organische Chemie
2005	Diplomarbeit am Institut Botanik II der Universität Karlsruhe (TH) zum Thema „Charakterisierung von DNA-Reparaturmutanten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> “
2005 – 2008	Doktorandin am Institut Botanik II der Universität Karlsruhe (TH). Thema der Arbeit: „Der RTR-Komplex in <i>Arabidopsis thaliana</i> – molekulare Charakterisierung von DNA- Reparaturmutanten“

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die praktischen Arbeiten, die zu den in dieser Arbeit zusammengefassten Daten führten, wurden im Zeitraum von August 2005 bis August 2008 am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen (Botanik II) der Universität Karlsruhe durchgeführt.

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Angaben, die dem Wortlaut oder Sinne nach anderen Werken entstammen, habe ich entsprechend kenntlich gemacht.

Weiterhin habe ich die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung vom 21. Dezember 2001 (bzw. 15. Januar 2002) beachtet.

Ort, Datum

Stefanie Suer