

Untersuchungen zur meiotischen Rekombination in *Arabidopsis thaliana*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Rebecca Judith Wurz-Wildersinn

aus Rastatt

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Holger Puchta

Korreferent: Prof. Dr. Jonathan P. Sleeman

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2007

DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde am Botanischen Institut der Universität Karlsruhe (TH), Lehrstuhl II – Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen, im Zeitraum von April 2004 bis Oktober 2007 angefertigt.

*Beginne das Schwere, wo es noch leicht ist,
tu das Große, wo es noch klein ist,
denn alles Schwere auf Erden
entspringt aus dem Leichten.*

Lao-tse

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Prof. Dr. Holger Puchta*, der mir ermöglicht hat diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen und für das in mich gesetzte Vertrauen. Ich schätze seine Fachkompetenz, die ihn zu einem hervorragenden Betreuer macht. Er konnte meine Arbeit jederzeit mit wertvollen Diskussionen und Ratschlägen voranbringen.

Bei Herrn *Prof. Dr. Jonathan P. Sleeman* bedanke ich mich vielmals für die Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt auch *Prof. Dr. Peter Nick* und seinem Team des Botanischen Instituts, Lehrstuhl I, für die Möglichkeit mikroskopische Arbeiten an seinem Institut durchzuführen. Für die Hilfsbereitschaft, die mir das gesamte Team während dieser Zeit entgegengebracht hat, bedanke ich mich herzlich.

Dr. Charles White von der Universität Blaise Pascal in Frankreich danke ich dafür, dass ich an seinem Institut eine Methode erlernen durfte, die von da an einen wesentlichen Bestandteil meiner experimentellen Arbeit ausmachte.

Viele Kollegen haben mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihnen möchte ich herzlich für ihre Unterstützung danken. *Dr. Wim Reidt* hat mich während der ersten Zeit meiner Doktorarbeit betreut. Mit seiner hilfsbereiten und freundlichen Art stand er mir jederzeit mit hilfreichen Tipps und Ratschlägen zur Seite und war mir eine große Unterstützung.

Bei PD Dr. *Frank Hartung* bedanke ich mich für die vielen inspirierenden Diskussionen, die mir durch sein umfangreiches Fachwissen oft neue Blickwinkel eröffneten. Ich möchte mich auch dafür bedanken, dass er kurzfristig die Korrektur der Manuskripte dieser Arbeit übernommen hat. Dr. *Manfred Focke* möchte ich meinen Dank für die sorgfältige Korrektur zahlreicher Arbeiten, einschließlich der vorliegenden Dissertation, aussprechen. Durch seine gewissenhafte Überprüfung der Texte und seine nützlichen Anregungen hatte er stets einen großen Anteil an deren erfolgreicher Fertigstellung. Bei *Sabine Buss* und *Pia Kunz* möchte ich mich für die exzellente technische Unterstützung bedanken. Sie haben mit ihrem gewissenhaften und präzisen Arbeiten einen wertvollen Beitrag zu vielen Experimenten geleistet. Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit bedanken. Allen voran danke ich *Kristina Wanieck* und *Stefanie Dukowic*, deren praktische und persönliche Hilfe vor allem in der Endphase meiner Doktorarbeit von großer Bedeutung für mich waren. Bei Kristina bedanke ich mich für die vielen aufmunternden Worte, die mir Zuversicht und neue Perspektiven schenkten.

Meinem Ehemann *Alexander Wildersinn* danke ich dafür, dass er mich über die gesamte Zeit meiner Doktorarbeit mit Geduld und Rücksicht begleitet hat. Insbesondere während der Endphase waren seine Unterstützung und sein Zuspruch von unermesslichem Wert und haben auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

INHALTSVERZEICHNIS

	INHALTSVERZEICHNIS	I
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
	ABSTRACT	IX
1.	EINLEITUNG	1
1.1	DIE BLÜTENBILDUNG	2
1.1.1	Genetische Regulation der Blütenbildung	2
1.1.2	Morphologische Veränderungen des Apikalmeristems	5
1.2	DIE ENTWICKLUNG VON BLÜTENPOLLEN UND SAMENANLAGEN	8
1.2.1	Die Entwicklung von Blütenpollen	8
1.2.2	Die Entwicklung von Samenanlagen	10
1.3	DIE MEIOSE	13
1.3.1	Die Stadien der Meiose	13
1.3.2	Struktur meiotischer Chromosomen	16
1.4	MEIOTISCHE REKOMBINATION	17
1.4.1	Die Mechanismen der meiotischen homologen Rekombination	17
1.4.2	Der Strangaustausch – homologes Chromosom oder Schwesterchromatid ? –	22
1.4.3	Meiotische Faktoren	23
1.4.3.1	Die Funktionsweise von SPO11	23
1.4.3.2	BRCA2 als Mediator der homologen Rekombination	25
1.4.3.3	TOP3 α und die Auflösung von Rekombinationsintermediaten	27
1.5	PAARUNG UND SYNAPSIS HOMOLOGER CHROMOSOMEN	29
1.5.1	Die prämeiotische Phase	30
1.5.2	Paarung meiotischer Chromosomen und SC-Bildung	31
1.5.3	Die Abhängigkeit zwischen Synapsis und Rekombination	32
1.5.4	Die Bouquet-Struktur	34
1.6	ZIEL DER ARBEIT	36

2	MATERIAL UND METHODEN	37
2.1	MATERIAL	37
2.1.1	Modellorganismen und Mutanten	37
2.1.2	Medien und Lösungen	37
2.1.3	Enzyme und Chemikalien	39
2.1.4	Geräte	40
2.1.5	Spezielle Software und Datenbanken	41
2.1.6	Primer	42
2.2	METHODEN	43
2.2.1	Pflanzenarbeiten	43
2.2.1.1	Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen	43
2.2.1.2	Oberflächensterilisation	44
2.2.1.3	Extraktion genomischer DNA	44
2.2.1.4	Screening nach homozygoten Mutanten	44
2.2.1.5	Sensitivitätstests	44
2.2.1.6	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien	45
2.2.1.7	RNA-Extraktion und Reverse Transkription	45
2.2.2	Real-time PCR	45
2.2.3	Cytologische Untersuchungen	46
2.2.3.1	DAPI-Färbung und Fluoreszenz-Mikroskopie	46
2.2.3.2	DIC-Mikroskopie	47
3	ERGEBNISSE	49
3.1	CHARAKTERISIERUNG VON <i>brca2</i> -MUTANTEN	49
3.1.1	Charakterisierung der BRCA2(IV)- und BRCA2(V)-T-DNA-Insertionsmutanten	49
3.1.2	Charakterisierung der <i>brca2(IV)/brca2(V)</i> -Doppelmutante	49
3.2	SOMATISCHE EFFEKTE DER BRCA2-MUTATION	53
3.2.1	Sind <i>brca2</i> -Mutanten sensitiv gegenüber Mutagenen?	53
3.2.2	Gen-Silencing	57
3.3	ENTWICKLUNGSSTÖRUNGEN DER REPRODUKTIONSORGANE	59
3.3.1	Phänotyp der Blüten	60

3.3.2	Die Entwicklung der Antheren	61
3.3.3	Die Entwicklung der Samenanlagen	62
3.3.4	Meiose in Pollenmutterzellen	67
3.3.4.1	Meiose in <i>A. thaliana</i> -Wildtyp	67
3.3.4.2	In <i>spo11</i> -Mutanten findet keine Bivalentbildung statt	69
3.3.4.3	Das Ausschalten von BRCA2 führt zur Fragmentierung der Chromosomen	72
3.3.4.4	Der Phänotyp der <i>rad51</i> -Mutante entspricht dem der <i>brca2</i> -Mutante	73
3.3.4.5	Der <i>top3α</i> -Phänotyp unterscheidet sich von dem der anderen Mutanten	73
3.3.4.6	Kreuzungen von Mutanten verschiedener Rekombinationsfaktoren	75
3.3.5	Die Mutation von TOP3 α führt zu Chromosomenfragmentierungen während der Mitose	78
4	DISKUSSION	81
4.1	DIE <i>brca2</i> (IV)/ <i>brca2</i> (V)-DOPPELMUTANTE	82
4.2	DAS AUSSCHALTEN VON REKOMBINATIONSFAKTOREN FÜHRT ZU FEHLENTWICKLUNGEN DER GAMETOPHYTEN	85
4.3	DER EINFLUSS MUTIERTER SPO11-, BRCA2- UND TOP3 α -PROTEINE AUF DEN ABLAUF DER MEIOSE	87
4.3.1	Die <i>spo11</i> -Mutanten	87
4.3.2	Die <i>brca2</i> (IV)/(V)-Mutante	91
4.3.3	Die <i>top3α</i> -Mutante	94
4.3.4	Doppelmutanten unterschiedlicher Rekombinationsfaktoren	97
4.3.5	Chromosomenfragmente in Doppelmutanten unterschiedlicher Rekombinationsfaktoren	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	103
6	LITERATUR	105
	ANHANG	
	Lebenslauf	143
	Publikationen	144

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Modell der genetischen Regulation der Blütenbildung	4
Abb. 2:	Spitzenmeristem mit Blütenprimordien	5
Abb. 3:	Bau einer Blüte von <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Abb. 4:	Spitzenmeristem mit Blütenprimordien	7
Abb. 5:	Reproduktionsorgane von <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Entwicklung von Blütenpollen	9
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Entwicklung des Embryosackes	11
Abb. 8:	Schematische Darstellung der meiotischen Teilungen	14
Abb. 9:	Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach dem Doppelstrangbruch-Reparatur-Modell	21
Abb. 10:	Meiotische S-Phase-Zelle	30
Abb. 11:	Charakterisierung der <i>brca2(IV)</i> -, <i>brca2(V)</i> und <i>brca2(IV)/(V)</i> -Mutanten	50
Abb. 12:	Gegenüberstellung von Wildtyp und <i>brca2(IV)/(V)</i>	52
Abb. 13:	Sensitivitätstest	54
Abb. 14:	Anzahl der Blätter nach Mutagenbehandlung von <i>A. thaliana</i> -Wildtyp, <i>brca2(IV)</i> , <i>brca2(V)</i> und <i>brca2(IV)/(V)</i>	55
Abb. 15:	Frischgewicht nach Mutagenbehandlung von <i>A. thaliana</i> -Col-0, <i>brca2(IV)</i> , <i>brca2(V)</i> und <i>brca2(IV)/(V)</i>	56
Abb. 16:	Ermittlung des Transkriptionsniveaus von <i>BRC A2</i> in MMC-behandelten <i>brca2(IV)</i> -Keimlingen mittels Real-time PCR	58
Abb. 17:	Phänotyp der Blüten	61
Abb. 18:	Entwicklung der Antheren im Vergleich zum Wildtyp	63
Abb. 19:	Entwicklung von Samenanlagen bei <i>A. thaliana</i> -Col-0	65
Abb. 20:	Samenanlagen von <i>spo11-1</i> , <i>spo11-2</i> , <i>spo11-1/spo11-2</i> , <i>brca2(IV)/(V)</i> , <i>rad51</i> und <i>top3α</i> im Vergleich zum Wildtyp	66
Abb. 21:	Meiose in <i>A.thaliana</i> -Col-0-Meiozyten	68
Abb. 22:	Meiose in Meiozyten der <i>spo11-1</i> -Mutante	70
Abb. 23:	Meiose in Meiozyten der <i>spo11-2</i> -Mutante	71
Abb. 24:	Meiose in Meiozyten der <i>spo11-1/spo11-2</i> -Mutante	71
Abb. 25:	Meiose in Meiozyten der <i>brca2(IV)/(V)</i> -Mutante	72

Abb. 26:	Meiose in Meiozyten der <i>rad51</i> -Mutante	74
Abb. 27:	Meiose in Meiozyten der <i>top3α</i> -Mutante	75
Abb. 28:	Meiose in Meiozyten der <i>spo11-2/rad51</i> -Doppelmutante	76
Abb. 29:	Meiose in Meiozyten der <i>top3α/spo11-2</i> -Doppelmutante	77
Abb. 30:	Meiose in Meiozyten der <i>top3α/rad51</i> -Doppelmutante	78
Abb. 31:	Mitosen von <i>top3α</i> , <i>top3α/spo11-2</i> und <i>top3α/rad51</i> im Vergleich zu <i>A. thaliana</i> -Col-0	79
Abb. 32:	Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach dem DSBR-Modell	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFD1	ABSENCE OF FIRST DIVISION 1
AG	AGAMOUS
AP1	APETALA 1
AP2	APETALA 2
AP3	APETALA 3
AS	Aminosäuren
ATM	ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED
ATR	ATAXIA-TELANGIECTASIA AND RAD3 RELATED
BLAP75	75 kDa BLM-ASSOCIATED PROTEIN
BLM	BLOOM SYNDROME PROTEIN
Bleo	Bleomycin
BRC	BRC-Repeat, BRCA2-eigenes Motif
BRCA1	BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY PROTEIN 1
BRCA2	BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY PROTEIN 2
BS	Bloom's Syndrom
CAL	CAULIFLOWER
cDNA	complementary DNA
CO	CONSTANS
CO	Crossover
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
dHJ	double Holliday Junction
DIC	Differential Interference Contrast
DIF1	DETERMINATE INFERTILE 1
DMC1	DISRUPTED MEIOTIC CDNA 1
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNAseI	Deoxyribonuclease I
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur
EME1	ESSENTIAL MEIOTIC ENDONUCLEASE 1
FD	FLOWERING LOCUS D

FG	Frischgewicht
FT	FLOWERING LOCUS T
GM	germination medium
HOP2	HOMOLOGOUS PAIRING PROTEIN 2
HR	Homologe Rekombination
LFY	LEAFY
MMC	Mitomycin C
MMZ	Megasporenmutterzelle
MND1	MEIOTIC NUCLEAR DIVISIONS 1
MRE11	MEIOTIC RECOMBINATION 11
mRNA	messenger-RNA
MRX	MRE11-RAD50-XRS2-Protein-Komplex
MSH4	MutS-Homologes 4
MSH5	MutS-Homologes 5
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum
MUS81	MMS AND UV SENSITIVE 81
NCO	Noncrossover
NHEJ	Nonhomologous End-joining
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	PISTILLATA
PMZ	Pollenmutterzelle
RAD51	RADIATION SENSITIVE PROTEIN 51
RAD51C	RADIATION SENSITIVE PROTEIN 51C
RAD54	RADIATION SENSITIVE PROTEIN 54
RMI1	RECQ MEDIATED GENOME INSTABILITY 1
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuclease
RPA	REPLICATION PROTEIN A
SC	synaptonemaler Komplex
SCC1	SISTER CHROMATID COHESION 1
SDSA	Synthesis-Dependent Strand-Annealing
SEI	Single-End-Invasion

SEP	SEPALLATA
SGS1	SLOW GROWTH SUPPRESSOR 1
SMC1	STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 1
SMC3	STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 3
SPO11	SPORULATION-SPECIFIC PROTEIN 11
SYN1	SYNAPSIS 1
TFL	TERMINAL FLOWER
TOP3	TOPOISOMERASE III
TOP3 α	TOPOISOMERASE III α
TOP3 β	TOPOISOMERASE III β
TOP6	TOPOISOMERASE VI
WT	Wildtyp

ABSTRACT

Meiotic recombination is a central step during meiosis and its accurate progression is essential for normal development of gametes. Defects occurring during meiosis can lead to impaired fertility, sterility or malformation and lethality of offspring, respectively. Processes going on during meiosis and in particular during meiotic recombination are complex and require a multitude of control and regulation factors. SPO11-1, SPO11-2, BRCA2 and TOP3 α are four proteins with essential functions as recombination factors and are subject of the present work. This thesis focuses on defects arising during meiosis and development of male and female gametes by eliminating the functionality of the above mentioned proteins. The analysis of gametophyte development in *Arabidopsis* wild type, *spo11-1*-, *spo11-2*-, *brca2*- and *top3 α* -mutants was carried out using fluorescence- and DIC-microscopy. Because BRCA2 has proven to be an essential mediator of homologous recombination in animals, it was further investigated, whether this protein plays a role during somatic DNA repair in *Arabidopsis thaliana*.

Both SPO11-1 and SPO11-2 are proteins introducing double-strand breaks during prophase of meiosis, and thus initiating meiotic recombination. Here it was shown that, in contrast to the common assumption that these proteins may have synergistic functions, they rather show functional interdependence. BRCA2 was demonstrated to be an essential factor during meiotic recombination of plants and also to play an important role during somatic repair of DNA-damages. For the first time it was shown that TOP3 α is an essential factor during meiosis of a higher eukaryote and that the protein probably performs this task by resolving intermediates that arise during meiotic recombination. Thus, the present work yields important new information that increases the knowledge about the complex pattern of meiosis.

1 EINLEITUNG

Die Meiose ist ein zentrales Ereignis im Lebenszyklus höherer Eukaryonten. Es handelt sich dabei um eine besondere Form der Zellteilung, die den Chromosomensatz einer Zelle von diploid zu haploid reduziert. Fusionieren die haploiden Kerne zweier Individuen, führt dies zur Vereinigung der beiden Erbanlagen und somit zur Entstehung eines neuen Genoms. Rekombinationsereignisse zwischen homologen Chromosomen der Eltern führen außerdem zur Neukombination von Genen, die unzählige Kombinationsmöglichkeiten bieten und somit unikale Nachkommen hervorbringen. Dieser Genaustausch ist von grundlegender Bedeutung für die evolutionäre Entwicklung des Lebens, da er nicht nur die Anpassung von Populationen an sich verändernde Umweltbedingungen ermöglicht, sondern eine kontinuierliche Umgestaltung der Lebensformen bewirkt. Diese Anpassungs- und Veränderungsvorgänge haben bis heute zu einer überwältigenden Vielfalt biologischer Arten geführt. Auch in Zukunft werden Evolutionsprozesse neue Arten mit besseren Adaptions- und Überlebensmöglichkeiten hervorbringen, was gerade in Zeiten sich drastisch verändernder Klimabedingungen an Bedeutung gewinnt.

Die Erforschung der Meiose ist eines der interessantesten Gebiete der modernen Molekularbiologie und liefert einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise von Organismen auf zellulärer Ebene. Die Untersuchung meiotischer Faktoren, die das Rekombinationsgeschehen beeinflussen und steuern, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Bevor jedoch Einzelheiten dieses Themenbereichs dargestellt werden, soll eine kurze Einführung in die Entwicklung pflanzlicher Reproduktionsorgane gegeben werden. Kenntnisse über die Entwicklung von Blüten und Blütenorgane bilden die Grundlage zur praktischen Ausführung dieser Arbeit.

1.1 DIE BLÜTENBILDUNG

1.1.1 Genetische Regulation der Blütenbildung

In den 30iger Jahren des letzten Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass das Signal zur Induktion der Blütenbildung in den Blättern der Pflanze produziert und zum Apikalmeristem weitergeleitet wird. Es wurde auch nachgewiesen, dass die Bildung dieses Signals photoperiodischen Regulationsvorgängen unterliegt (Knott, 1934). Der Signalstoff, der die Information über die lange Strecke vom Blatt bis zum Apikalmeristem transportiert, wurde von Chailakhyan (1936) als „Florigen“ bezeichnet. Heute weiß man, dass der Anstoß zur Blütenbildung nicht nur von einem Faktor abhängig ist, sondern von einer Vielfalt exogener und endogener Einflüsse gesteuert wird. Sie sind an der Kontrolle des Übergangs vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum beteiligt und regulieren sowohl Aktivität als auch Identität von Meristemen und differenzierten Geweben (Koornneef, 1991; siehe auch Review Okamoto et al., 1993).

Die Reproduktionsorgane entstehen durch die Ausstülpungen von Blütenprimordien an den Seiten des Apikalmeristems (Abb. 2). Während des vegetativen Wachstums differenzieren sich diese Primordien zu Laubblättern und können sich erst nach dem Signal zur Blütenbildung zu Blütenprimordien entwickeln (Hempel et al., 1998). Während des Übergangs vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum wird die undifferenzierte Entwicklung des Spitzenmeristems durch blütenspezifische Regulatorgene unterdrückt. Während dieses Wechsels wird das vegetative Meristem in das Infloreszenzmeristem umgewandelt, das dann seitlich Blütenmeristeme bildet (siehe Reviews Komada, 2004; Blazquez et al., 2006). Dieser Übergang wird von einer Signalkaskade ausgelöst an deren Anfang eine Vielfalt exogener und endogener Faktoren stehen und die schließlich in Schlüsselfaktoren der Blühinduktion zusammenlaufen. Zu den endogenen Regulatorproteinen gehören unter anderem APETALA 1 (AP1) / CAULIFLOWER (CAL) und LEAFY (LFY) (Weigel et al., 1992; Kempin et al., 1995).

Exogen wird die Blütenbildung durch photoinduktive und photoperiodische Signale gesteuert. Die Photoinduktion ist ein wichtiges Signal, auf das vor allem *Arabidopsis thaliana* sehr schnell mit der Bildung von Blüten reagiert. Die Wirksamkeit, mit der photoinduktive Signale auf die Differenzierungsrichtung von Primordien einwirken, hängt von der Fähigkeit des Apikalmeristems ab, auf die Induktion zu antworten. Diese Fähigkeit wiederum ist durch die Menge des Transkriptionsfaktors LFY bedingt (Blazquez et al., 1997). LFY reguliert die

Differenzierung und die Identität der Blütenorgane (Weigel et al., 1992) hauptsächlich durch Aktivierung von AP1 (Mandel und Yanofsky, 1995; Wagner et al., 1999). Während der photoinduktive Signalweg und die LFY-Expression im Apikalmeristem lokalisiert sind, findet die photoperiodische Regulation überwiegend in den Blättern statt. Für die Langtagpflanze *Arabidopsis thaliana* wurde zur Beschreibung der photoperiodischen Regulation das sog. Koinzidenz-Modell erstellt. Nach diesem Modell findet eine tägliche Oszillation der *CONSTANS*-mRNA (*CO*) statt, die ca. zwölf Stunden nach Beginn des Tageslichtes ihren Höchststand erreicht (Suarez-Lopez et al., 2001). Somit erlangt die *CO*-mRNA unter Kurztagsbedingungen ihren Spitzenwert während der Dunkelheit; das *CO*-Protein ist jedoch nur im Licht stabil (Valverde et al., 2004). Unter Langtagbedingungen erreicht die *CO*-mRNA ihren Höchstwert während der Tageslichtphase, wodurch *CO* stabilisiert wird und dessen Proteinmenge steigt. Über einen positiven Rückkopplungsmechanismus führt dies zur Akkumulation von *CO* (Valverde et al., 2004). *CO* aktiviert seinerseits das Blühinduktionsprotein FLOWERING LOCUS T (*FT*) (Suarez-Lopez et al., 2001). Als Reaktion auf Langtagbedingungen wandert *FT* von den Blättern zum Apex und interagiert mit dem bZIP-Protein FLOWERING LOCUS D (*FD*) (Abe et al., 2005; Jaeger und Wigge, 2007). Die Expression von *FD* findet an den Initiationsstellen der Blütenprimordien (an den Seiten des Apikalmeristems) statt und wird während der Induktion der Blütenbildung hoch reguliert. In der Anwesenheit von *FT* ist *FD* in der Lage eine Reihe wichtiger Zielproteine zu induzieren, darunter AP1/*CAL1* (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). AP1/*CAL* ist wichtig für den Übergang vom Infloreszenz- zum Blütenmeristem (Bowman et al., 1993) und wird zum Zeitpunkt des Erscheinens der ersten Blütenprimordien exprimiert (Kempin et al., 1995).

Während AP1 und LFY in den Blütenprimordien exprimiert werden, um das meristematische Gewebe zu erhalten, wird deren Expression im Infloreszenzmeristem durch TERMINAL FLOWER (*TFL*) unterdrückt (Simon et al., 1996; Liljegren et al., 1999). Nach der anfänglichen Aktivierung durch *FT*/*FD* verstärken sich AP1 und LFY später gegenseitig selbst: AP1 wird durch LFY direkt aktiviert (Wagner et al., 1999) und AP1 ist an der Erhaltung der LFY-Expression durch Unterdrückung der *TFL*-Aktivität beteiligt (Liljegren et al., 1999).

Die Differenzierung pflanzlicher Blütenorgane wird von einer Vielfalt homöotischer Gene reguliert, darunter neben *APETALA 1* (*AP1*) auch *APETALA 2* (*AP2*), *APETALA 3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) und *AGAMOUS* (*AG*) (Bowman et al., 1989; Bowman et al., 1991; Drews et al., 1991; siehe auch Review Krizek und Fletcher, 2005). Nach seiner früheren Funktion der Blüteninitiation nimmt AP1 nun an der Entwicklung der perianthen Organe, der Sepalen und

Petalen, Teil. Auch LFY kommen nach der Initiation der Blütenbildung weitere Funktionen zu; durch Aktivierung von APETALA 3 (AP3), PISTILLATA (PI) und AGAMOUS (AG) hat LFY eine Beteiligung an der Entwicklung der Staubblätter und des Fruchtknotens (Huala und Sussex, 1992; Jenik und Irish, 2001; Lamb et al., 2002; siehe auch Review Sablowski, 2007).

Dieses Modell der Blütenbildung wurde von Coen und Meyerowitz (1991) aufgestellt und als ABC-Modell bezeichnet. Die Buchstaben A, B und C stehen für die Abfolge der Expression verschiedener Faktoren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Blütenentwicklung aktiv sind und deren Vorhandensein sich in bestimmten Stadien überlappt. Abbildung 1 gibt sehr vereinfacht ein schematisches Modell des Expressionsmusters wieder. So induziert die Expression der A-Gene die Entwicklung der Kelchblätter und zusammen mit den B-Genen die Entstehung der Blütenblätter. Die Expression der B-Gene zusammen mit den C-Genen führt zur Entwicklung der Staubblätter und die der C-Gene alleine zur Bildung der Fruchtblätter. Heute wurde das Modell der Blütenbildung zum ABCE-Modell erweitert, das die Funktionen der SEPALLATA-Proteine (SEP) mitberücksichtigt, die für die Identität der Blütenorgane wichtig sind. Während der frühen und mittleren Phase der Blütenentwicklung werden *SEP1* und *SEP2* in allen vier Blütenwirteln exprimiert und sind somit für die Entwicklung aller Blütenorgane wichtig. Die Expression von *SEP3* findet innerhalb der Wirtel zwei bis vier statt und ist für die Entfaltung der Blüten-, Staub- und Fruchtblätter von Bedeutung (Pelaz et al., 2000; Malcomber und Kellogg, 2005; siehe auch Review Robles und Pelaz, 2005).

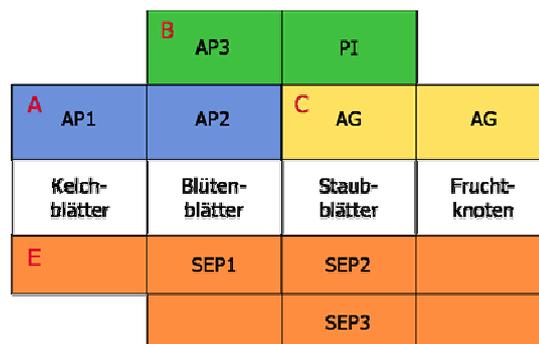


Abb. 1: Modell der genetischen Regulation der Blütenbildung. Die Gruppe A besteht aus AP1 und AP2, sie reguliert die Entwicklung der Kelchblätter. Die Gruppe B besteht aus AP3 und PI, zusammen mit den Genen der Gruppe A kontrolliert sie die Entwicklung der Blütenblätter. Die Gruppe C entspricht AG, zusammen mit den B-Proteinen induziert sie die Entwicklung der Staubblätter. Die Gruppe C alleine reguliert die Bildung der Fruchtblätter. Die Gruppe E besteht aus SEP1, SEP2 und SP3. *SEP1* und *SEP2* werden in allen vier Blütenwirteln exprimiert, sie kontrollieren die Entwicklung aller Blütenorgane. *SEP3* reguliert die Bildung von Blüten-, Staub- und Fruchtblättern.

1.1.2 Morphologische Veränderungen des Apikalmeristems

Die morphologische Entwicklung von Blüten wurde von Smyth et al. (1990) durch elektronenmikroskopische Aufnahmen an *A. thaliana* demonstriert und die einzelnen Entwicklungsschritte genau charakterisiert. Sie teilen die Entwicklung junger Blüten in zwölf Stadien ein, die im Folgenden kurz wiedergegeben werden sollen.

Zur Zeit der Blütenbildung bildet das Apikalmeristem eine Kuppel aus Zellen, die einen Durchmesser von etwa 45 μm besitzt. Im Stadium 1 der Blütenbildung entsteht an den Seiten des Apikalmeristems eine kleine Wölbung, die durch laterales Wachstum an Größe zunimmt. Ab einem Durchmesser von 22-25 μm wird das Primordium durch eine Furche vom Apex abgegrenzt und Stadium 2 der Entwicklungsphase beginnt. Das Wachstum des halbkugelförmigen Primordiums setzt sich in einem rechten Winkel zum Hauptapex fort. Sobald die Primordien der Kelchblätter erscheinen, hat die Blütenknospe das 3. Entwicklungsstadium erreicht. Die Pflanze ist zu diesem Zeitpunkt ca. zwei Wochen alt und die ersten Blütenknospen sind in der Mitte der Blattrosette erkennbar. Dies bedeutet, dass die ersten Blütenprimordien bei ca. zwölf Tage alten Pflanzen entstehen müssen. Das Primordium des abaxialen Kelchblatts erscheint zuerst gefolgt vom adaxialen und den lateralen (Abb. 2). Sobald die Kelchblatt-

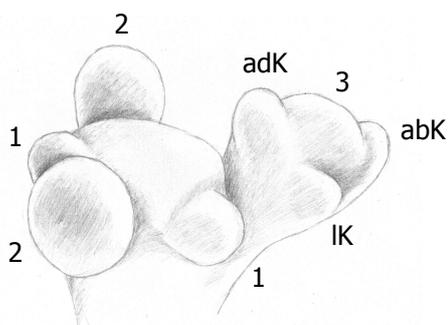


Abb. 2: Spitzenmeristem mit Blütenprimordien. Die reiferen Blütenknospen liegen außerhalb der Primordien und wurden in dieser Zeichnung weg gelassen. **1**, Primordien in Stadium 1 der Blütenentwicklung; **2**, Primordien in Stadium 2; **3**, Primordium in Stadium 3, die Entwicklung der Kelchblätter beginnt; **abK**, abaxiales Kelchblatt; **adK**, adaxiales Kelchblatt; **IK**, laterales Kelchblatt (eigene Zeichnung, in Anlehnung an Smyth et al., 1990)

primordien die Blütenprimordien überwachsen beginnt Stadium 4. Nun erfolgt eine Verlängerung des Blütenstiels, begleitet von einer Größenzunahme der Blütenknospe auf einen Durchmesser von 65-70 μm . Mit dem Auftreten von Staubblatt- und Blütenblatt-Vorläufern geht die Blütenknospe in das 5. Entwicklungsstadium über (Smyth et al., 1990). Während dieses Stadiums entwickeln sich zuerst die Primordien der medialen, längeren Staubblätter und etwas später die der lateralen, kürzeren Staubblätter (Abb. 3 A, B) durch perikline Teilung der L2-

Schicht des Spitzenmeristems (Abb. 4) (Smyth et al., 1990; Jenik und Irish, 2000). Wenn die lateralen und medialen Kelchblätter die Knospe vollständig umschließen beginnt Stadium 6. Um die zentrale Kuppe des Blütenprimordiums bildet sich ein Kranz, der einen ovalen Hohlraum formt, das spätere Gynoeceum (Abb. 5 A). Die Blütenblätter nehmen während dieser Zeit nur wenig an Größe zu. Stadium 7 der Entwicklungsstufen ist erreicht, wenn die Primordien der langen Staubblätter beginnen, einen Stiel auszubilden, der sich zum Filament der Staubblätter weiterentwickelt (Abb. 5 B). Während sich die medialen Staubblätter strecken führt auch das Gynoeceum ein vertikales Wachstum durch. Die Primordien der Blütenblätter sind in dieser Phase noch immer sehr klein und bilden eine halbkugelförmige Struktur. Sobald an den medialen Staubblättern eine konvexe Wölbung auf der inneren Seite entsteht, geht die Blütenknospe in Stadium 8 ihrer Entwicklung über. Aus der inneren Wölbung entwickelt sich später der Staubbeutel. Die Staubblätter haben zu diesem Zeitpunkt eine Länge von 55-60 μm , die zum Großteil durch die sich entwickelnde Anthere gebildet wird (Smyth et al., 1990). Während des 8. Stadiums erscheinen auch die Pollensäcke der Antheren (Sessions, 1997). Das Wachstum der Blütenblätter findet nun ebenfalls verstärkt statt. Vor allem im folgenden 9. Entwicklungsstadium

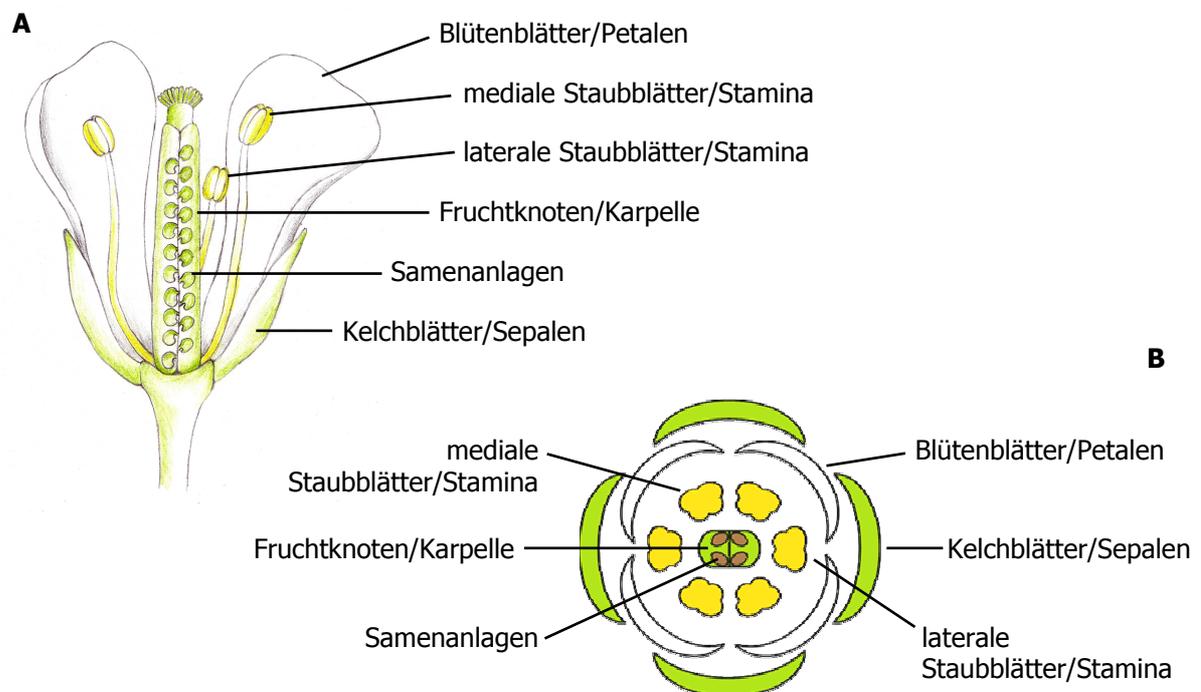


Abb. 3: Bau einer Blüte von *Arabidopsis thaliana*. (A) Längsschnitt; (B) Blütenschema

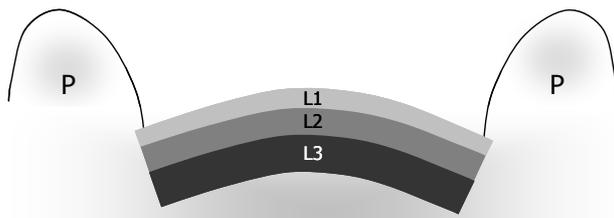


Abb. 4: Spitzenmeristem mit Blütenprimordien. Primordien (P), L1-Schicht (L1), L2-Schicht (L2), L3-Schicht (L3)
(eigene Abbildung, in Anlehnung an Sablowski, 2007)

vergrößern sich die mittlerweile zungenförmigen Blütenblätter beträchtlich, um das Vier- bis Fünffache. Auch alle anderen Organe nehmen während dieses Stadiums deutlich an Länge zu. Das Wachstum der Stamina findet hauptsächlich in der Antherenregion statt, die immer noch 80% der Gesamtlänge ausmacht. Das Gynoeceum verlängert sich weiter als offener, ovaler Schlauch. Die Kelchblätter wachsen in dieser Zeit simultan, sodass die Blütenknospe jederzeit vollständig von ihnen eingeschlossen ist. Sobald die Blütenblätter die Spitze der langsamer wachsenden lateralen Staubblätter erreichen, beginnt Stadium 10 der Blütenentwicklung. Kurz darauf bilden sich an der Kuppel des Fruchtknotens stigmatische Papillen, der Beginn von Stadium 11 (Smyth et al., 1990). Nach Sessions (1997) findet die Entwicklung der Papillen etwas früher, im 9. Entwicklungsstadium, statt. Beobachtungen aus unseren Experimenten sprechen ebenfalls für eine frühere Papillenbildung. Bis Stadium 11 findet kaum eine Differenzierung des Fruchtknotens statt und die zentrale, schlauchförmige Öffnung bleibt bis zu diesem Stadium erhalten. Sobald die Blütenblätter die Spitze der langen Stamina erreicht haben gehen die

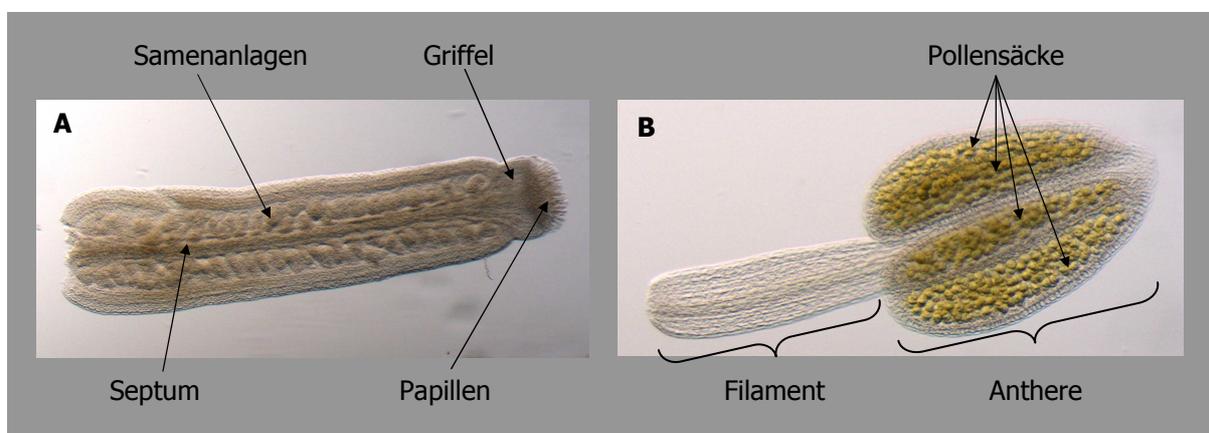


Abb. 5: Reproduktionsorgane von *Arabidopsis thaliana*. Die Blütenorgane wurden entfärbt, dadurch sind im Fruchtblatt (A) die Samenanlagen und im Staubblatt (B) die Blütenpollen zu erkennen.

Knospen in ihr 12. Wachstumsstadium über. Dieses Stadium entspricht B2 nach einer Charakterisierung von Müller (1961). Während Stadium 12 nehmen die Blütenblätter schnell an Länge zu. Auch der Fruchtknoten und die Staubblätter führen in dieser Zeit ein Längenwachstum durch, während das Wachstum der Kelchblätter stagniert. Die Antheren der kurzen und der langen Staubblätter haben fast ihre endgültige Größe von 350-400 μm erreicht und die Filamente verlängern sich deutlich. Der obere Bereich des Gynoeceums differenziert sich in einen 100-120 μm langen Griffel mit einer konischen Struktur, die zu einer leichten Einschnürung an der Basis des Griffels führt (Abb. 5 A) (Sessions, 1997). Somit ist der Griffel durch eine klare Grenze von der Papillenhaube getrennt. Das 12. Stadium endet mit dem Öffnen der Kelchblätter und die Blütenknospe geht in Stadium 13 (Smyth et al., 1990) bzw. B3 (Müller, 1961) über. Zwischen den Kelchblättern erscheinen die Blütenblätter, die sich nun rasch verlängern. Die Narbe kann zu diesem Zeitpunkt bereits befruchtet werden. Während dieser Zeit führen die Staubblätter weiterhin ihr Längenwachstum durch, wodurch die medialen Stamina den Fruchtknoten überwachsen (Smyth et al., 1990).

1.2 DIE ENTWICKLUNG VON BLÜTENPOLLEN UND SAMENANLAGEN

1.2.1 Die Entwicklung von Blütenpollen

Die männliche Gametogenese startet in der L2-Schicht des Spitzenmeristems (Abb. 4) durch Bildung einer primären Wandzelle und einer primären sporogenen Zelle. Die primäre Wandzelle bildet später verschiedene konzentrische Schichten, die sich zu Endothecium, Mittelschicht und Tapetum differenzieren. Aus der sporogenen Zelle entstehen die zahlreichen Pollenmutterzellen (PMZ) (Regan und Moffatt, 1990; Goldberg et al., 1993). Die Pollenmutterzellen werden von einer β -1 \rightarrow 3-Glucan-Schicht (Callose) umhüllt, die sie morphologisch von den Tapetumzellen abgrenzt (Regan und Moffatt, 1990; Ma, 2005). Die meiotische Entwicklung der Blütenpollen verläuft synchron innerhalb eines Pollensackes, da die PMZ mit Beginn der Meiose ein Coenobium bilden, das die Zellen durch große Plasmodesmen verbindet (Heslop-Harrison, 1966a; 1966b; Mascarenhas, 1975). Durch zwei aufeinander folgende meiotische Teilungen werden aus einer Pollenmutterzelle schließlich vier haploide Mikrosporen (Abb. 6). Die vier

Zellen werden als Tetrade in einer Callosehülle zusammengehalten, während jede einzelne Zelle zusätzlich von einer Callosehülle umgeben ist. Während dieses Stadiums werden die cytoplasmatischen Verbindungen zwischen den Mikrosporen aufgehoben und vier unabhängige Zellen entstehen (Bird et al., 1983). Die Mikrosporen beginnen mit der Auflagerung einer Pollenwand, die zunächst eine primäre Exine bildet und bereits während des Tetradenstadiums sichtbar wird (Heslop-Harrison, 1963). Durch das Enzym Callase wird die Callosehülle der Tetrade aufgelöst und der Verbund aus vier Mikrosporen aufgehoben (McCormick, 1993). Nach der Freisetzung der Mikrosporen bilden sich kleine Vakuolen, die sich im weiteren Verlauf der

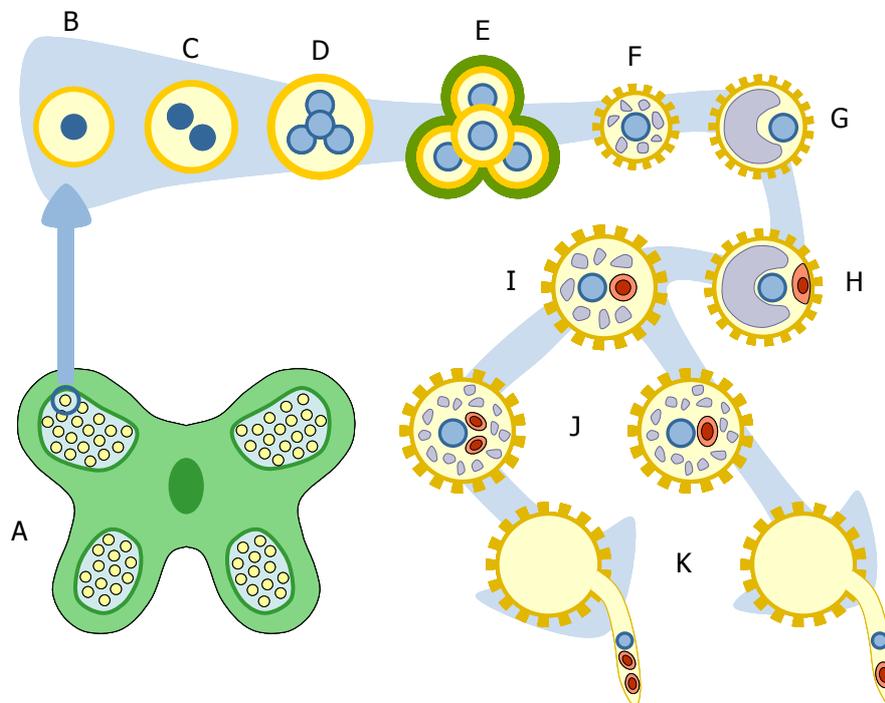


Abb. 6: Schematische Darstellung der Entwicklung von Blütenpollen. **A**, Anthere mit Pollenmutterzellen (PMZ); **B**, Pollenmutterzelle (diploid); **C**, erste meiotische Teilung; **D**, zweite meiotische Teilung, es entstehen vier haploide Zellen; **E**, Tetrade, die vier Zellen werden in einer Callosehülle zusammengehalten, jede einzelne Zelle ist zusätzlich von einer Callosehülle umgeben, die Zellen beginnen mit der Auflagerung einer Pollenwand; **F**, die Callosehülle der Tetrade wird durch das Enzym Callase aufgelöst und die Mikrosporen freigesetzt, es entwickeln sich mehrere kleine Vakuolen; **G**, die kleinen Vakuolen schließen sich zu einer großen zusammen, es kommt zur Verlagerung des Zellkerns auf eine Seite der Zelle; **H**, es findet eine asymmetrische Zellteilung statt, aus der eine große vegetative und eine kleine generative Zelle hervorgehen, die generative Zelle ist mit der inneren Pollenwand verbunden; **I**, Reabsorption der Vakuole, die generative Zelle löst sich von der Pollenwand; **J**, **K**, in vielen Pflanzenarten teilt sich die generative Zelle vor der Freisetzung aus den Antheren ein weiteres Mal, in einigen Arten findet die zweite Teilung erst nach der Bildung des Pollenschlauches statt.

Pollenreifung zu einer großen zusammenschließen (Regan und Moffatt, 1990; Horvitz und Herskowitz, 1992). Die Größenzunahme der Vakuole bedingt eine schnelle Volumenzunahme der Zelle und die Verlagerung des Zellkerns auf eine Seite der Zelle (Regan und Moffatt, 1990; Horvitz und Herskowitz, 1992). Dies führt zur Polarisierung der Zelle, die während der weiteren Entwicklung eine asymmetrische mitotische Teilung der Mikospore zur Folge hat, aus der eine große vegetative und eine kleine generative Zelle hervorgehen (Horvitz und Herskowitz, 1992). Die erste mitotische Teilung geht mit der Reabsorption der Vakuole einher (Regan und Moffatt, 1990). Die generative Zelle umgibt sich mit einer dünnen Callosewand, die zunächst mit der inneren Pollenwand, der Intine, verbunden ist. Nach Abbau der Calloeschicht löst sich die generative Zelle von der Pollenwand und wird vom Cytoplasma der vegetativen Zelle umhüllt (Howden et al., 1998; Lalanne und Twell, 2002). In vielen Pflanzenarten teilt sich die generative Zelle bereits vor der Freisetzung der Blütenpollen aus den Pollensäcken ein weiteres Mal, wodurch zwei identische generative Zellen entstehen. In einigen Arten erfolgt diese Teilung jedoch erst nach der Keimung des Pollens, also nach der Bildung des Pollenschlauches (Lalanne und Twell, 2002).

1.2.2 Die Entwicklung von Samenanlagen

Die Untersuchung weiblicher Samenanlagen in Pflanzen erfolgte hauptsächlich am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*, da hier der Embryosack durch nur fünf Zellschichten, die kein Chlorophyll enthalten, bedeckt ist (Schneitz et al., 1995). Die Entwicklung der Samenanlagen findet in einem für die Familie *Brassicaceae* typischen syncarpen Fruchtknoten statt (Esau, 1977). Er besteht aus zwei verwachsenen Carpellen und enthält zwei Hohlräume mit jeweils zwei Reihen an Samenanlagen, die den gegenüberliegenden Plazenten entspringen und Reißverschluss-ähnlich ineinander greifen (Okada et al., 1989; Robinson-Beers et al., 1992; Modrusan et al., 1994). Die beiden Hohlräume entstehen durch ein Septum, das aus der wandständigen Plazenta heraus wächst (Robinson-Beers et al., 1992; Modrusan et al., 1994).

Wie bereits unter Kapitel 1.1.2 beschrieben, entstehen die Primordien des Fruchtknotens bei *Arabidopsis* während des 6. Stadiums der Blütenbildung als ringförmiger, ovaler Kranz (Smyth et al., 1990; Sessions, 1997). Während des 7. Stadiums verlängert sich der Fruchtknoten als offener, bilateraler Zylinder mit einem medialen Grat – die Stelle an der sich später die Plazenta und das Septum bilden werden (Sessions, 1997). Im 8. Stadium beginnen die inneren, medialen

Wände des Fruchtknotens einwärts zu wachsen und bilden kurz darauf auf jeder Seite zwei vertikal zueinander stehende Plazenten (Sessions, 1997). Während Stadium 9 entstehen aus der Plazenta die Samenanlagen, die in jeweils zwei Reihen beidseitig des Septums angeordnet sind (Smyth et al., 1990; Sessions, 1997). Die Primordien der Samenanlagen entstehen durch subepidermale, perikline Teilung im Gewebe der Plazenta und wachsen zunächst zu kegelförmigen Strukturen heran (Hill und Lord, 1989). Die Entwicklung des Septums wird im zehnten Stadium durch Fusion der nach innen wachsenden Zellschichten abgeschlossen, wodurch ein Fruchtknoten mit zwei verwachsenen Carpellen entsteht. Während des 11. Stadiums bilden die jungen Samenanlagen einen Funiculus und die Integumente, aus denen später die

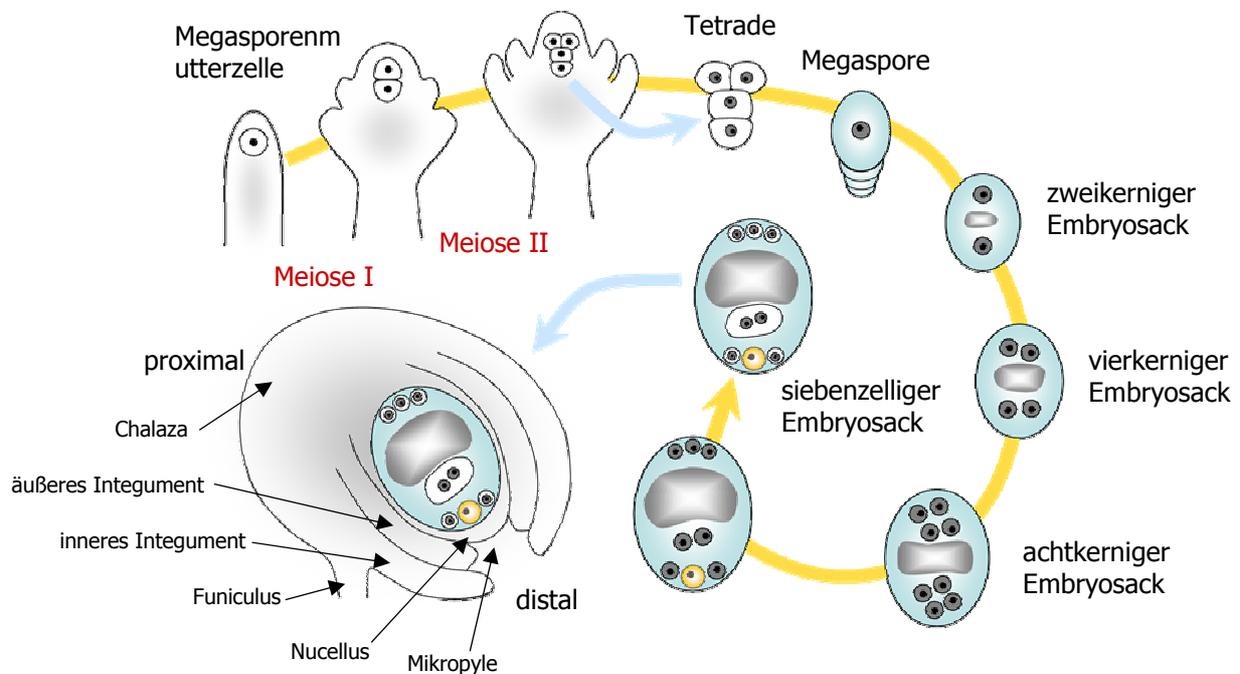


Abb. 7: Schematische Darstellung der Entwicklung des Embryosackes. Die Megasporenmutterzelle durchläuft zwei meiotische Teilungen, es entstehen vier haploide Kerne (Tetrade). Die Zelle, die auf der Chalaza zugewandten Seite liegt, entwickelt sich zur Megaspore, die drei weiteren Zellen degenerieren. Die Megaspore durchläuft drei mitotische Teilungen, aus denen zunächst ein zweikerniger, dann ein vierkerniger und schließlich ein achtkerniger Embryosack hervorgeht. Mit den Mitosen geht die Bildung einer Vakuole einher, die zwischen den ersten beiden Kernen entsteht und sich kontinuierlich vergrößert. Die acht Kerne des Embryosackes nehmen ihre endgültige Position ein und es findet eine Zellbildung statt: am proximalen Ende bilden sich die Antipoden, am distalen Ende entstehen eine Eizelle und zwei Synergiden (Eiapparat), im Zentrum bildet sich eine zweikernige Polzelle. Bei einigen Pflanzenarten verschmelzen die Polkerne und es entsteht ein sekundäres Endosperm.

Samenschale entsteht (Abb. 7) (siehe Review Boavida et al., 2005). Zu beiden Seiten des Nucellus entstehen zwei Integumente, das innere und das äußere, die jeweils aus zwei Zellschichten bestehen. Im Laufe der Entwicklung umwachsen die Integumente den Nucellus, wobei eine kleine Lücke zurück bleibt, die Mikropyle (Smyth et al., 1990; Schneitz et al., 1995) – die Öffnung durch die später der Pollenschlauch wächst und die Befruchtung der Eizelle stattfindet. Die Entwicklung der Ovarien ist im zwölften Stadium abgeschlossen (Smyth et al., 1990; Sessions, 1997).

Die Sporogenese beginnt mit der Differenzierung der Megasporenmutterzelle in der hypodermalen Zellschicht am distalen Ende des Nucellus (Maheshwari, 1950; Reiser und Fischer, 1993). Die Megasporenmutterzelle durchläuft zwei meiotische Teilungen aus denen vier haploide Kerne entstehen. Nur eine dieser Zellen wird sich zur Megaspore weiterentwickeln, während die anderen degenerieren (Abb. 7) (Golubovskaya et al., 1992). Die Zellen sind über Plasmodesmen verbunden, über die vermutlich auch das Signal zur Degeneration von der Megaspore an die drei weiteren haploiden Zellen gesendet wird. Welche der Zellen zur Megaspore wird, hängt von der Lage der Zellen innerhalb des Nucellus ab; die Zelle, die der Chalaza am nächsten ist, entwickelt sich zur Megaspore (Bajon et al., 1999; Armstrong und Jones, 2001).

Während der Gametogenese durchläuft die verbleibende Megaspore drei mitotische Teilungen aus denen zunächst ein zweikerniger, dann ein vierkerniger und schließlich ein achtkerniger Embryosack entsteht (Abb. 7) (Schneitz et al., 1995; siehe auch Review Boavida et al., 2005). Der achtkernige Embryosack enthält vier Kerne an jedem Pol, die durch eine große Vakuole getrennt sind (Grossniklaus und Schneitz, 1998). Die Vakuole des Embryosackes entsteht bereits nach der ersten Teilung und taucht zwischen den beiden Tochterkernen auf. Während der anschließenden Zellularisierung entstehen drei Zellen am proximalen Ende, die sog. Antipoden. Am distalen Ende erscheinen eine Eizelle und zwei Synergiden (der Eiapparat) und im Zentrum eine große, zweikernige Polzelle (Grossniklaus und Schneitz, 1998). Bei einigen Pflanzenarten verschmelzen die Polkerne, so dass ein sekundäres Endosperm entsteht, bei anderen Arten fusionieren die Kerne nur teilweise vor der Befruchtung (Grossniklaus und Schneitz, 1998; siehe auch Review Boavida et al., 2005).

In etwa zum Zeitpunkt der Polkern-Fusion wird am inneren Integument eine dritte Zellschicht gebildet. In der Familie der Kreuzblütler können hier weitere Zelllagen entstehen, während das äußere Integument zweischichtig bleibt (Bouman, 1975; Schneitz et al., 1995). Während die Entwicklung der Samenanlage fortschreitet verändert sich deren Form von

campylotrop (die Samenanlage liegt seitlich auf dem Funiculus, die Mikropyle zeigt seitlich nach unten) während der Blütezeit zu amphitrop (campylotrope Ausrichtung, der Embryosack ist jedoch stark gebogen) zur Zeit des achtkernigen Endosperm-Stadiums (Robinson-Beers et al., 1992).

1.3 DIE MEIOSE

1.3.1 Die Stadien der Meiose

Die Funktion der Meiose beruht auf der Reduktion des Chromosomensatzes eines diploiden Organismus und der Bildung von Keimzellen. Dazu durchläuft die Zelle zwei aufeinanderfolgende Teilungen, denen jedoch nur eine Replikationsrunde vorausgeht. Nach der Replikation des Chromosomensatzes hat die Zelle die Möglichkeit entweder eine mitotische Teilung zu durchlaufen oder die Meiose einzuleiten. Durch Anlagerung verschiedener Faktoren an die Chromosomen findet bereits während der S-Phase die Festlegung in Richtung meiotischer Prophase statt (Ito und Takegami, 1982; Sheridan et al., 1996; 1999; Pawlowski et al., 2007; siehe auch Review Hamant et al., 2006). Das Stadium der Prophase läuft sehr langsam ab, was eine genaue Beobachtung der Vorgänge auf chromosomaler Ebene ermöglicht. Aufgrund der Veränderungen, die die Chromosomen während dieser Phase erfahren unterscheidet man fünf cytologisch differenzierbare Prophasestadien. Abbildung 8 zeigt schematisch die einzelnen Stufen der meiotischen Prophase und der beiden anschließenden meiotischen Teilungen.

Die meiotische Prophase beginnt mit dem *Leptotän*, das durch erste Kondensations-schritte der Chromosomen gekennzeichnet ist und ihnen das Erscheinungsbild langer, dünner Fäden verleiht. Der Nukleolus bildet eine große Struktur, die mehr als ein Drittel des Kernvolumens einnimmt. Zu Beginn des Leptotäns nimmt er eine zentrale Position innerhalb des Kerns ein und wandert gegen Ende des Leptotäns in Richtung Kernperipherie, wo er im weiteren Verlauf der Prophase zu finden ist (Armstrong und Jones, 2003). Während des Übergangs von der G2-Phase zum Leptotän bilden sich kurze Bereiche chromosomaler Achsen, aus denen vermutlich das axiale Element hervorgeht (Armstrong und Jones, 2003; Revenkova et al., 2004; siehe auch Review Zickler und Kleckner, 1999). Eine typische Struktur des Leptotäns

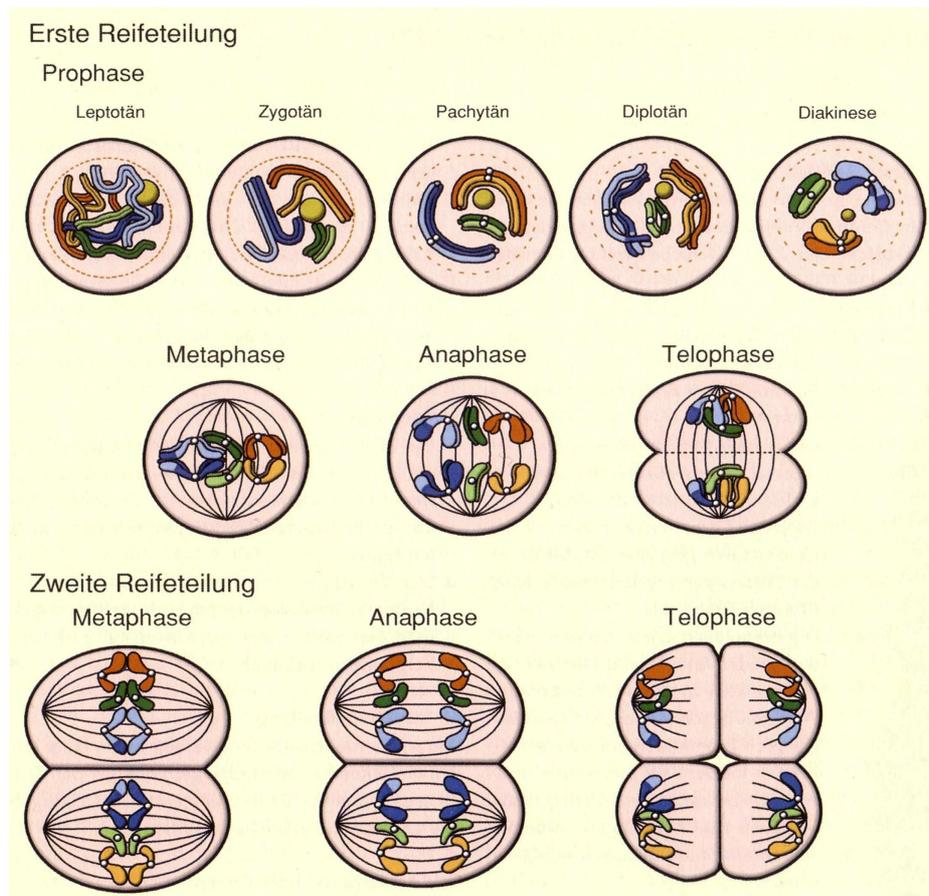


Abb. 8: Schematische Darstellung der meiotischen Teilungen. **Leptotän:** anfängliche Kondensation der Chromosomen, die Chromosomen erscheinen als lange, dünne Fäden, der Nukleolus nimmt zu Beginn des Leptotäns eine zentrale Position innerhalb des Kerns ein; **Zygotän:** Paarung der homologen Chromosomen, der synaptonemale Komplex (SC) beginnt sich aufzubauen, die Prozesse werden durch die Bildung von Doppelstrangbrüchen begleitet; **Pachytän:** die Bildung des SC wird abgeschlossen; **Diplotän:** der SC löst sich wieder auf, die homologen Chromosomen streben auseinander, sie bleiben über Chiasmata, die aus Rekombinationsprodukten hervorgehen, miteinander verbunden; **Diakinese:** die Chromosomen verdichten sich weiter und lösen sich von der Kernhülle; **Metaphase I:** Anordnung der Chromosomenpaare in der Äquatorialebene, die Chromosomen sind maximal kondensiert; **Anaphase I:** die homologen Chromosomen werden getrennt und wandern zu gegenüberliegenden Polen der Zelle; **Telophase I:** Dekondensation der Chromosomen; **Metaphase II:** Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene; **Anaphase II:** Segregation der Schwesterchromatiden, bei *Arabidopsis thaliana* entstehen hier vier Chromatidgruppen mit jeweils fünf Chromatiden; **Telophase II:** Dekondensation der Chromatiden, aus der anschließenden Cytokinese geht eine Tetrade mit vier haploiden Zellen hervor

(Quelle: Lüttge, Kluge, Bauer; Botanik; 5. Auflage, 2005; Wiley-VCH, Weinheim)

bilden die sog. *Chromomere*, die dadurch entstehen, dass sich einige Chromatinabschnitte stärker kondensieren als andere (Egel, 1975). Im Stadium des *Zygotäns* beginnen die homologen Chromosomen sich zu paaren während sich gleichzeitig entlang der Kontaktstellen am axialen Element ein zentrales Element ausbildet, wodurch eine dreigliedrige Struktur entsteht, die als *synaptonemaler Komplex (SC)* bezeichnet wird (Moses, 1969; von Wettstein et al., 1984; Albini, 1994; siehe auch Review Heyting, 1996). Durch quer verlaufende Filamente, die waagrecht zur zentralen Region liegen, erhält der Aufbau des SC eine Reißverschluss-ähnliche Struktur (Schmekel et al., 1993a; 1993b; de Boer und Heyting, 2006; Hunter, 2007). Die Paarung homologer Chromosomen wird zudem durch die Einführung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), die zur Bildung interhomologer Rekombinationsprodukte führen, stabilisiert (Schwacha und Kleckner, 1994) – ein Prozess, der für den weiteren Verlauf der Meiose essentiell ist, da er sowohl die korrekte Ausbildung der Bivalente als auch die gleichmäßige Segregation der Chromosomen während der ersten meiotischen Teilung gewährleistet (z.B. Keeney et al., 1997; Grelon et al., 2001; Lichten, 2001; Storlazzi et al., 2003; Tessé et al., 2003, Stacey et al., 2006). Einige dieser Rekombinationsintermediate entwickeln sich zu sog. *Chiasmata* weiter, die den Positionen von Crossover entsprechen (siehe Review Holm, 1986). Während des *Pachytäns* wird die Bildung des synaptonemalen Komplexes vollständig abgeschlossen und die nun stabil verknüpften Chromosomenpaare werden als Bivalente bezeichnet. Die Chromosomen erscheinen während dieses Stadiums deutlich kürzer als in den Stadien zuvor (Fransz et al., 1998). Während des *Diplotäns* löst sich der SC wieder auf und die homologen Chromosomen streben auseinander. Allerdings kommt es nicht zur vollständigen Trennung der Homologen, da sie an Chiasmata bis zur Metaphase I zusammengehalten werden (Armstrong und Jones, 2003). Im letzten Stadium der Prophase, der *Diakinese*, verdichten sich die Chromosomen stark und lösen sich von der Kernhülle. Während der *Metaphase I* ordnen sich die Bivalente in der Äquatorialebene der Zelle an; sie sind zu diesem Zeitpunkt maximal kondensiert und enthalten jeweils ein bis drei Chiasmata pro Chromosom (Armstrong und Jones, 2003). Die Chromosomenpaare sind nun für den Eintritt in die erste meiotische Teilung vorbereitet. In der folgenden *Anaphase I* werden die Chiasmata aufgelöst, die homologen Chromosomen werden voneinander getrennt und wandern jeweils zu gegenüberliegenden Polen der Zelle. Während der anschließenden *Telophase I* kommt es zu einer leichten Dekondensation der Chromosomen und die Zelle geht, ohne eine weitere Interphase zu durchlaufen, in die zweite meiotische Teilung über (Armstrong und Jones, 2003). Wie die erste Teilung beginnt auch die zweite Reduktionsteilung mit der Anordnung der Chromosomen in den Äquatorialebenen während

Metaphase II. Während die erste Teilung der Trennung der homologen Chromosomen diente, findet innerhalb der *Anaphase II* die Separation der Schwesterchromatiden statt, die sich ebenfalls auf die gegenüberliegenden Pole zu bewegen. Auf diese Weise entstehen vier Chromosomengruppen, bestehend aus jeweils fünf Chromatiden, die während *Telophase II* erneut dekondensieren und eine Tetrade bilden. Bei *Arabidopsis thaliana* findet erst nach der zweiten meiotischen Teilung eine Cytokinese statt (Armstrong und Jones, 2003). Die Dauer der Meiose von der S-Phase bis zum Tetradenstadium beträgt bei *A. thaliana* 36 Stunden (Armstrong und Jones, 2003).

Im Unterschied zur männlichen Meiose, bei der sich alle vier Mikrosporen zu Blütenpollen entwickeln, unterliegen bei der weiblichen Meiose drei der vier Zellen einer Degeneration; es bleibt also nur eine Makrospore übrig, aus der im weiteren Verlauf der Entwicklung unter anderem die Eizelle hervorgeht (Armstrong und Jones, 2003)

1.3.2 Struktur meiotischer Chromosomen

Meiotische Chromosomen besitzen eine genau definierte Struktur aus Schleifen und Achsen (Moens und Pearlman, 1988). Die Schleifen bestehen aus Chromatin und können in ihrem Ausmaß von einem Organismus zum anderen stark variieren – von ungefähr 20 Kilobasen (kb) bei der Bäckerhefe zu ca. 2500 kb bei einigen Insekten (siehe Review Moens et al., 1998; Hunter, 2007). Die Chromatinschleifen eines Schwesterchromatidenpaars sind an ihrer Basis durch eine lineare, stabförmige Achse verknüpft. Zusammengehalten wird diese Struktur vermutlich durch Cohesin-Moleküle, die eine Basis für die Anlagerung weiterer Proteine bilden, aus denen sich die achsenförmige Struktur assembliert (Moens, 1973; Molnar et al., 1995; 2003). Diese Achsen bilden die Grundlage für den Aufbau des synaptonemalen Komplexes nach der Paarung der homologen Chromosomen (Klein et al., 1999; Page und Hawley, 2004). Die Achsen der Homologen entsprechen den lateralen Elementen, die innerhalb des SC eine zentrale Region flankieren. Filamente, die quer zur zentralen Region verlaufen verleihen dem SC eine geriffelte, Reißverschluss-ähnliche Struktur (Schmekel et al., 1993a; 1993b; de Boer und Heyting, 2006; Hunter, 2007).

1.4 MEIOTISCHE REKOMBINATION

1.4.1 Die Mechanismen der meiotischen homologen Rekombination

Homologe Rekombination (HR) findet grundsätzlich dann statt, wenn ein endogen oder exogen verursachter Doppelstrangbruch (DSB) der DNA entsteht. Die Reparatur des DSB findet während der HR unter Zuhilfenahme eines homologen, komplementären DNA-Bereichs statt, wodurch eine fehlerfreie Reparatur und die Erhaltung der Integrität des Genoms gewährleistet wird.

Zwischen der somatischen und der meiotischen HR besteht jedoch ein wesentlicher Unterschied: In somatischen Zellen entstehen DSBs durch Schädigung der DNA, die durch exogene oder endogene Faktoren verursacht werden können. Exogene Einflüsse können z.B. UV-Strahlung, radioaktive Strahlung oder mutagene Chemikalien sein, während endogen verursachte DSBs durch mechanische Belastungen der DNA oder während Replikationsprozessen entstehen können. Zu Beginn der Meiose werden DSBs dagegen gezielt durch eine enzymatische Reaktion eingebracht. Durch die Reparatur dieser Strangbrüche werden Rekombinationsprozesse eingeleitet und es entstehen DNA-DNA-Interaktionen, die für die Paarung und Synapsis homologer Chromosomen essentiell sind. Die Mechanismen der Chromosomenpaarung, Synapsis und Rekombination sind unmittelbar miteinander verknüpft und voneinander abhängig. Während der meiotischen Prophase führen diese Prozesse zur Bildung von Rekombinationsintermediaten und zum Aufbau einer stabilen Bivalentstruktur. Sie laufen in drei wesentlichen Schritten ab: [1] Zunächst erfolgt die Paarung der Homologen durch Annäherung der Chromosomen und erste Homologiesuche. [2] Zwischen gepaarten Chromosomen wird der SC aufgebaut und es entstehen Bivalente, was die anfängliche Paarung stabilisiert. [3] Paarung und Synapsis homologer Chromosomen sind von Rekombinationsprozessen begleitet, beginnend mit der Bildung von Doppelstrangbrüchen, über die Reparatur der DSBs bis hin zum reziproken Austausch von Chromosomenarmen (Crossover). Es ist von großer Bedeutung, dass diese Prozesse fehlerfrei ablaufen, da Fehler schwerwiegende Folgen haben. So führen Störungen während der Meiose beim Menschen zu Unfruchtbarkeit der Nachkommen, zu Fehlgeburten und schweren Geburtsfehlern (siehe Reviews Page und Hawley, 2003; Engel et al., 2004).

Eine Reihe an Proteinen ist für das Gelingen des Zusammenspiels von Chromosomenpaarung und Rekombination notwendig. Dazu gehören nach der Initiation der Rekombination

durch SPORULATION-SPECIFIC PROTEIN 11 (SPO11) (z.B. Keeney et al., 1997; Grelon et al., 2001; Lichten, 2001; Stacey et al., 2006) unter anderem die Proteine DISRUPTED MEIOTIC CDNA 1 (DMC1), RADIATION SENSITIVE PROTEIN (RAD) 51 (Bishop et al., 1992; Shinohara et al., 1992; Bishop, 1994; Rockmill et al., 1995; Anderson et al., 1997; Li et al., 1997; Doutriaux et al., 1998; Li et al., 2004), BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY PROTEIN 2 (BRCA2) (Kojic et al., 2002; Sharan et al., 2004; Siaud et al., 2004), RAD54 (Cole et al., 1989; Kanaar et al., 1996; Klein, 1997; Muris et al., 1997; Shinohara et al., 1997; Arbel et al., 1999; Bishop et al., 1999; Schmuckli-Maurer und Heyer, 2000; Shinohara et al., 2000), RAD51C (Abdu et al., 2003; Abe et al., 2005; Bleuyard et al., 2005; Li et al., 2005; Kuznetsov et al., 2007; Liu et al., 2007), MEIOTIC NUCLEAR DIVISIONS 1 (MND1), HOMOLOGOUS PAIRING PROTEIN 2 (HOP2) (Gerton und DeRisi, 2002; Tsubouchi und Roeder, 2002; Petukhova et al., 2003; Zierhut et al., 2004; Petukhova et al., 2005; Domenichini et al., 2006; Henry et al., 2006; Kerzendorfer et al., 2006; Pezza et al., 2006), REPLICATION PROTEIN A (RPA), ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED (ATM), ATAXIA-TELANGIECTASIA AND RAD3 RELATED (ATR) (Keegan et al., 1996; Plug et al., 1997; Barlow et al., 1998; Gasior et al., 1998; Moens et al., 1999; Soustelle et al., 2002; Garcia et al., 2003) und TOPOISOMERASE III (TOP3/TOP3 α) (Gangloff et al., 1999; Kaliraman et al., 2001). Diese Proteine stellen nur einen Auszug der Vielzahl an Proteinen dar, die regulatorisch auf Rekombinationsprozesse einwirken, und sollen einen Eindruck über die Komplexität dieses Mechanismus vermitteln. Zusammen mit SPO11 sind die Proteine BRCA2 und TOP3 α Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit; auf jedes der Proteine soll daher am Ende dieses Kapitels etwas genauer eingegangen werden.

In Pflanzen, Hefe und Säugetieren können Rekombinationereignisse bereits während des Leptotäns beobachtet werden (Padmore et al., 1991; Mahadevaiah et al., 2001; Pawlowski et al., 2004). Während dieses Stadiums entstehen an mehreren Stellen Verknüpfungen zwischen den Achsen homologer Chromosomen, die durch beginnende Rekombinationsmechanismen verursacht werden. Diese Verbindungsstellen enthalten Rekombinationsproteine wie z.B. die RECA-Homologen RAD51 und DMC1 (Zickler et al., 1992; Weiner und Kleckner, 1994; Ikeya et al., 1996; Anderson et al., 1997; Barlow et al., 1997; Sehorn und Sung, 2004; siehe auch Review Zickler und Kleckner, 1999). Im Laufe des Pachytäns bildet sich eine zweite Form an Rekombinationsknoten, die etwas größer, dichter und runder sind und vor allem weniger häufig vorkommen. Diese als späte Rekombinationsknoten bezeichneten Strukturen entsprechen den Positionen, die sich zu Crossover weiter entwickeln und während des Diplotäns als Chiasmata

erscheinen (Croft und Jones et al., 1989; Sherman und Stack, 1995; Hunter, 2007; siehe auch Review Holm, 1986).

Die meiotische Rekombination beginnt universell mit dem Einbringen von Doppelstrangbrüchen, katalysiert durch das Protein SPO11 (z.B. Keeney et al., 1997; Grelon et al., 2001; Lichten, 2001; Stacey et al., 2006). Dieser initiale Schritt ist essentiell für das Fortschreiten und den Übergang in die weiteren Stadien der Meiose. In der Abwesenheit von SPO11 oder dessen katalytischer Funktion werden zwar axiale Elemente gebildet, homologe Chromosomen zeigen jedoch nur eine schwache Erkennungs-Tendenz und bilden keine SCs aus (Grelon et al., 2001; Storlazzi et al., 2003; Tessé et al., 2003; Stacey et al., 2006). Werden in *spo11*-Mutanten fehlende, endogen gebildete DSBs durch die Induktion von DSBs, z.B. mit einer geringen Strahlendosis oder einer VMA1-abhängigen Endonuklease, kompensiert, kann die Paarung und Synapsis der Homologen wieder hergestellt werden (Thorne und Byers, 1993; Neale et al., 2002; Storlazzi et al., 2003).

Damit jedoch DSBs durch SPO11 eingebracht werden können, muss eine Replikationsrunde vorausgehen, da das Vorhandensein von Schwesterchromatiden der Zelle möglicherweise als Sicherheit dient. Sollte das homologe Chromosom nicht gefunden werden oder nicht zugänglich sein, würde somit das Schwesterchromatid als Matrize zur DNA-Reparatur zur Verfügung stehen (Borde et al., 2000). Wie in Hefe gezeigt wurde, treten DSBs bevorzugt in Chromatinloops auf und sind über Rekombinosomen mit ihren Achsen verbunden (Blat et al., 2002).

Nach der Induktion von DSBs ist SPO11 kovalent mit dem 5'-Ende des Doppelstrangbruches verbunden und bildet ein Spo11p-DNA-Intermediat. Durch den MRE11-RAD50-XRS2-Protein-Komplex (MRX) wird SPO11 anschließend entfernt und die 5'-DSB-Enden nucleolytisch abgebaut (MRE11, MEIOTIC RECOMBINATION 11) (Trujillo et al., 2003; Bleuyard et al., 2004; Waterworth et al., 2007). Es entstehen 3'-Einzelstrang-Überhänge von 500 oder mehr Nucleotiden (Sun et al., 1989; 1991; Cao et al., 1990; Jessop et al., 2005). Interessanterweise wird in *S. cerevisiae* die Exonuclease-Aktivität von MRE11 durch XRS2 leicht erhöht, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von RAD50, während die endonucleolytische Funktion nur innerhalb des gesamten MRX-Komplexes gefördert wird (Trujillo et al., 2003). Nach Abbau der 5'-DNA-Enden führt zunächst einer der beiden DNA-Einzelstränge, vermittelt durch RAD51 und DMC1, einen Strangaustausch mit einem homologen Doppelstrang durch. Dieser Prozess wird als Single-End-Invasion (SEI) bezeichnet und resultiert in der Bildung einer D-Loop-Struktur (Abb. 9). Im nächsten Schritt dringt der zweite Einzelstrang in das selbe

homologe Chromosom ein, was zur Bildung einer „double Holliday Junction“ (dHJ) führt (Schwacha und Kleckner, 1995; Hunter und Kleckner, 2001). Die anschließende DNA-Reparatur kann in zwei oder mehr (Argueso et al., 2004) alternative Reparaturwege gelenkt werden, die zur Bildung von Crossover- oder Noncrossover-Produkten führt (Gilbertson und Stahl, 1996; Borts et al., 2000; Allers und Lichten, 2001a; Hunter und Kleckner, 2001; Börner et al., 2004). Dass Crossover und Noncrossover über verschiedene Wege entstehen, wurde zunächst an *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt (Allers und Lichten, 2001a; Hunter und Kleckner, 2001); eine ähnliche Situation scheint jedoch auch bei *Arabidopsis* zu existieren (Higgins et al., 2004). Die Verzweigung zu unterschiedlichen Rekombinationsprodukten entsteht vermutlich bereits während des Single-End-Invasion-Schrittes (Hunter und Kleckner, 2001; Börner et al., 2004).

Das dHJ-Intermediat kann durch strukturspezifische Endonucleasen (Resolvasen) aufgelöst werden, die festlegen in welcher Orientierung die dHJ aufgelöst wird und ob dabei eine Genkonversion oder ein Crossover entsteht (Abb. 9) (Puchta et al., 1996; Puchta, 1999a; b; Orel et al., 2003; Symington und Holloman, 2004; siehe auch Reviews Heyer et al., 2003; Heyer, 2004). Oder es kommt zu einer konvergenten Branchmigration, katalysiert durch eine Topoisomerase und eine Helikase. Über diesen zweiten Weg entstehen nur Noncrossover (NCO) (Plank et al., 2006; siehe auch Review Wang, 2002). Vor allem aus Hefestudien geht hervor, dass es sich bei der beteiligten Topoisomerase um Topoisomerase III (TOP3) und bei der Helikase um SLOW GROWTH SUPPRESSOR 1 (SGS1) handelt (Bachrati und Hickson, 2003). Diese Funktion von Topoisomerasen und Helikasen soll im Kapitel 1.4.3.3 noch einmal aufgegriffen und genauer erläutert werden. Interessanterweise sind in *Schizosaccharomyces pombe* die Vorläufer von CO zum größten Teil „single Holliday Junctions“, die vermutlich ebenfalls durch eine strukturspezifische Resolvase, bestehend aus MUS81 (MMS AND UV SENSITIVE 81) und EME1 (ESSENTIAL MEIOTIC ENDONUCLEASE 1), aufgelöst werden (Cromie et al., 2006).

Zur Bildung von NCO wird ein weiterer Weg diskutiert, der nicht über SEI und dHJ-Intermediate verläuft – das sog. „Synthesis-Dependent Strand-Annealing“ (SDSA) (Allers und Lichten, 2001b; Jessop et al., 2005). Beim SDSA-Modell dringt ein DSB-Ende in das entsprechende homologe Chromosom ein und verwendet es als Matrize zur DNA-Synthese. Der neu gebildete DNA-Strang wird verdrängt und lagert sich an die komplementäre Sequenz des zweiten DSB-Endes an, wodurch der Bruch geschlossen werden kann (siehe Review Pâques und Haber, 1999).

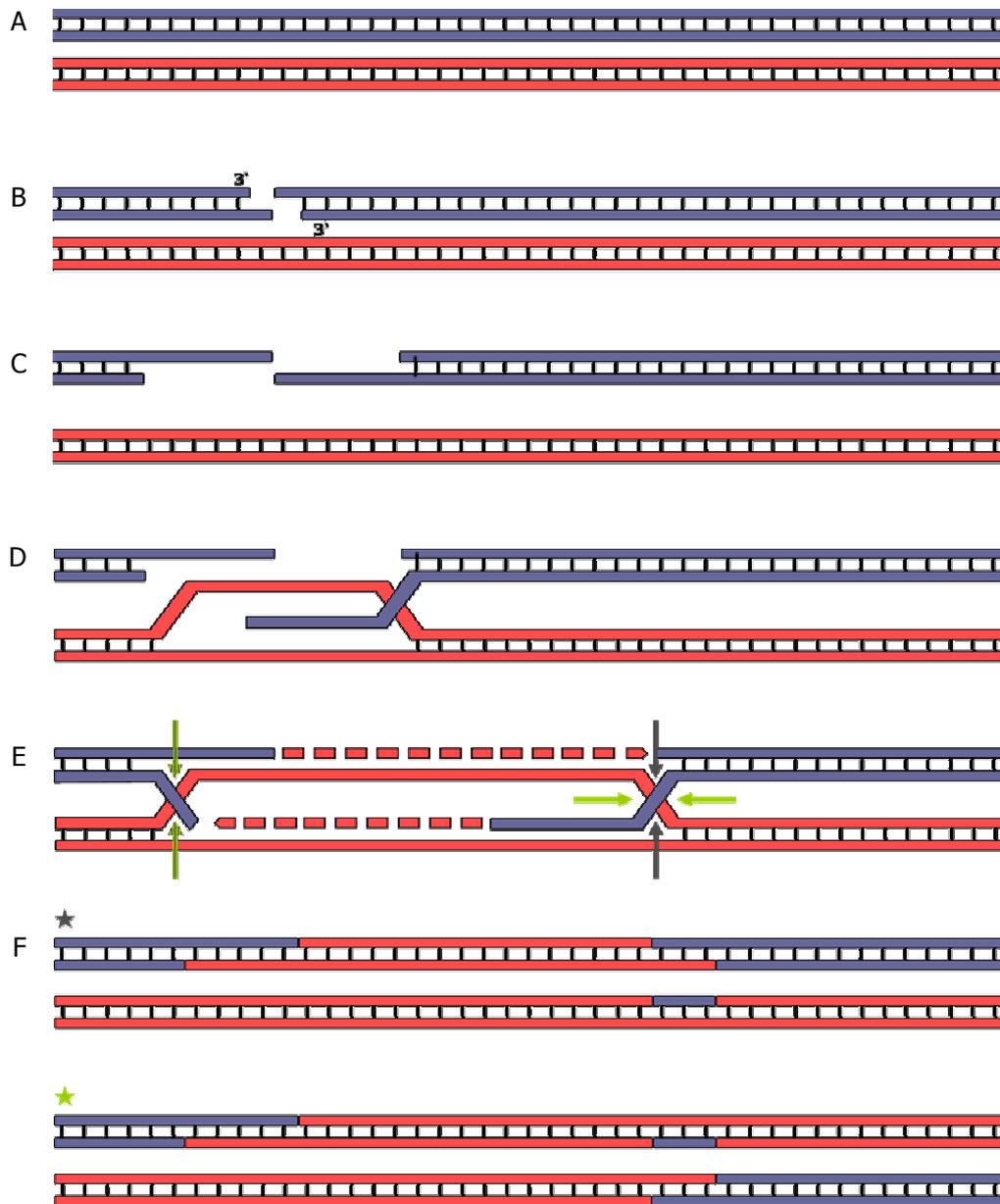


Abb. 9: Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach dem Doppelstrangbruch-Reparatur-Modell. **A**, Es ist ein Chromosom, bestehend aus zwei Schwesterchromatiden in blau und das homologe Chromosom in rot dargestellt; **B**, Bildung eines Doppelstrangbruches (DSB); **C**, nucleolytischer Abbau der DNA-Enden in 5'→3'-Richtung durch den MRX-Komplex, es entstehen 3'-Einzelstrang-Überhänge; **D**, Single End Invasion, ein Einzelstrang führt, katalysiert durch RAD51/DMC1, einen Strangaustausch mit dem homologen Bereich eines Partnerchromosoms durch; **E**, der zweite Strang dringt in den homologen Bereich ein, es entsteht eine double Holliday Junction (dHJ), die DNA-Synthese findet statt, Proteine zur Auflösung der dHJ-Struktur lagern sich an das Rekombinationsintermediat an; **F**, Auflösung des Rekombinationsprodukts, es kann ein Crossover (unten) oder ein Noncrossover (oben) entstehen.

Die meisten Eukaryonten bilden nur ein Crossover pro Chromosom oder Chromosomenarm, unabhängig von Genomgröße und Chromosomenlänge. Dabei verhindert die Anwesenheit eines Crossovers die Bildung eines weiteren in unmittelbarer Nähe. Dieses Phänomen wird als Crossover-Interferenz bezeichnet (siehe Review Pawlowski und Cande, 2005). Der Mechanismus der Crossover-Interferenz ist bisher nicht vollständig geklärt, durch Untersuchungen an Hefe konnte jedoch gezeigt werden, dass die Interferenz bereits vor der Synapsis stattfindet (Fung et al., 2004). Möglicherweise sind es mechanische Kräfte, die bei der Bildung von Crossover auftreten und die Entstehung weiterer Crossover erschweren (Kleckner et al., 2004).

1.4.2 Der Strangaustausch

– homologes Chromosom oder Schwesterchromatid ? –

Ein weiterer Unterschied zwischen somatischer und meiotischer Rekombination besteht in der bevorzugten Verwendung des homologen Chromosoms anstelle des Schwesterchromatids zur Reparatur eines Strangbruchs während der Meiose (Schwacha und Kleckner, 1994). Dieser Vorzug ist entscheidend für die Bildung von Chiasmata, die cytologisch die Positionen der Crossover darstellen. Das Vorhandensein von Chiasmata ist essentiell für den Zusammenhalt der Bivalente nach dem Stadium des Pachytäns. Nach der Auflösung des SC im Verlauf des Diplotäns gewährleisten diese Überkreuzungsstellen den weiteren Zusammenhalt der Homologen und eine gleichmäßige Segregation während der ersten meiotischen Teilung (Zetka et al., 1999; siehe auch Reviews Bascom-Slack et al., 1997; Moore und Orr-Weaver, 1998; Pawlowski und Cande, 2005). Die Präferenz, das homologe Chromosom als Matrize zur DNA-Reparatur zu verwenden, scheint eine Funktion des lateralen Elementes des SC zu sein (Schwacha und Kleckner, 1994). Dabei verhindert vermutlich das Protein MAPK/ERK-Kinase 1 (MEK1) als Bestandteil des lateralen Elementes die Rekombination mit dem Schwesterchromatid (Schwacha und Kleckner, 1997; Wan et al., 2004). Auch in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* wurden Proteine mit ähnlichen Funktionen nachgewiesen, was bedeutet, dass diese Organismen analoge Mechanismen zur Bevorzugung des Partnerchromosoms besitzen (Couteau et al., 2004; Webber et al., 2004).

Die Suche nach homologen Sequenzen erfordert sowohl die Anwesenheit von RAD51 als auch von DMC1. Fehlt eines der beiden Proteine führt dies zu schweren chromosomalen Aberrationen und Entwicklungsstörungen (Bishop et al., 1992; Shinohara et al., 1992; Rockmill

et al., 1995; Couteau et al., 1999; Li et al., 2004). Es stellt sich die Frage, weshalb während der Meiose zwei Rekombinasen für die Homologiesuche erforderlich sind, während in mitotischen Zellen nur RAD51 benötigt wird. Für die Suche nach homologen DNA-Abschnitten scheinen zumindest in *S. cerevisiae* zwei unterschiedliche Mechanismen zu existieren (Tsubouchi und Roeder, 2003). Über einen Weg wird zunächst RAD51 auf das Chromosom geladen, das anschließend DMC1-Moleküle rekrutiert. Dieser Weg erfordert weitere Faktoren wie HOP2 und MND1 (Tsubouchi und Roeder, 2002; 2003; Chen et al., 2004), die zunächst DNA-DNA-Interaktionen stabilisieren, bevor ein DMC1-vermittelter Strangaustausch stattfinden kann (Chen et al., 2004; Petukhova et al., 2005; Henry et al., 2006; Pezza et al., 2006; Ploquin et al., 2007). Alternativ dazu wurde durch Untersuchungen von Zierhut et al. (2004) auch vorgeschlagen, dass HOP2 und MND1 hauptsächlich an der Chromatin-Struktur agieren und eine eher globale Funktion erfüllen, in dem sie z.B. das Chromatin für Paarungs- und Rekombinationsproteine leichter zugänglich machen. Dieser DMC1-abhängige Weg ist möglicherweise für den interhomologen Austausch von DNA-Strängen ausschlaggebend. Aus Hefestudien geht hervor, dass eine Deletion von DMC1 im Verlust interhomologer Rekombinationsintermediate resultiert, während Rekombinationsprodukte zwischen Schwesterchromatiden nach wie vor vorhanden sind (Schwacha und Kleckner, 1997). Beim zweiten Weg erfolgt der Strangaustausch in Abhängigkeit von RAD51 und erfordert keine DMC1-Proteine (Tsubouchi und Roeder, 2002; Chen et al., 2004). Allerdings bedarf die Aktivität von RAD51 zur Bildung eines D-Loops RAD54 als weiteren Faktor (Sung et al., 2003), während DMC1 diese Funktion alleine erfüllt (Sehorn et al., 2004). In *C. elegans* und *Drosophila* wurden bis heute weder DMC1 noch HOP2 und MND1 gefunden, was vermuten lässt, dass andere Mechanismen zur Homologie-Suche verwendet werden (siehe Review Pawlowski und Cande, 2005).

1.4.3 Meiotische Faktoren

1.4.3.1 Die Funktionsweise von SPO11

SPO11 ist innerhalb der Eukaryonten ein hoch konserviertes Protein und strukturell mit der Untereinheit A der archaebakteriellen TOPOISOMERASE VI (TOP6) verwandt (Hartung und Puchta, 2001; Yin et al., 2002; siehe auch Review Keeney, 2001). Die TOP6 ist eine Typ IIB-Topoisomerase (Bergerat et al., 1997; Nichols et al., 1999; Hartung und Puchta, 2000; 2001;

Hartung et al., 2002), ein Enzym, das beide DNA-Stränge spaltet und superhelikale DNA entspannt. Analog der Funktionsweise von TypII-Topoisomerasen katalysiert wahrscheinlich auch SPO11 die Bildung von Doppelstrangbrüchen durch eine Transesterifikation. Allerdings ist SPO11 nicht in der Lage den für diese Enzymgruppe typischen Mechanismus des Zwei-Tore-Weges zu katalysieren (Corbett und Berger, 2003). Dieser setzt voraus, dass sich SPO11 spangenförmig um den Doppelstrang legt, wobei sich die Spange zu zwei Seiten öffnen kann. Die geschlossene, aktive Seite bildet einen Strangbruch während das zweite Tor geöffnet ist. Der intakte Strang wird durch den Strangbruch geleitet während sich die aktive Seite öffnet und das zweite Tor geschlossen wird. Befindet sich der intakte Strang auf der aktiven Seite wird diese geschlossen und das gegenüberliegende Tor geöffnet. Der zweite Strang kann nun ebenfalls geschnitten werden.

Da beide DNA-Stränge gespalten werden, muss man davon ausgehen, dass diese Aufgabe durch eine koordinierte Aktivität eines SPO11-Dimers ausgeführt wird (Nichols et al., 1999; Diaz et al., 2002). Da es bisher nicht gelungen ist, SPO11 durch Proteinaufreinigung zu gewinnen, gestaltet sich der *in vitro*-Nachweis dieser Aktivität allerdings schwierig (z.B. Wu et al., 2004). Eindeutige Hinweise dafür, dass es sich bei SPO11 tatsächlich um die spaltende Untereinheit des Komplexes handelt, wurden durch *in-vivo*-Untersuchungen des DNA-SPO11-Komplexes erlangt (Keeney et al., 1997; Neale et al., 2005).

Den meisten Organismen fehlt die B-Untereinheit der Topoisomerase VI, die normalerweise die beiden A-Untereinheiten brückenartig miteinander verbindet (Corbett und Berger 2003). Über einen ATP-Binde- und Hydrolyse-Zyklus werden durch TOP6B Konformationsänderungen durchlaufen, die das TOP6A-Tor öffnen und schließen. *Arabidopsis* und andere höhere Pflanzen bilden dabei in zweierlei Hinsicht eine interessante Ausnahme. Zum einen wurden in *A. thaliana* drei SPO11-Proteine gefunden, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie als SPO11-1, SPO11-2 und SPO11-3 bezeichnet wurden (Hartung und Puchta, 2000; 2001; Yin et al., 2002). Des Weiteren besitzen *Arabidopsis* und andere Pflanzen ein TOP6B-Homologes (BIN3), dem bisher jedoch keine Beteiligung an der Meiose nachgewiesen werden konnte. Anstatt dessen arbeitet AtTOP6B (BIN3) mit SPO11-3 (BIN5) zusammen und ist als funktionelle TOP6AB-Topoisomerase wichtig für die Entwicklung der Pflanze (Hartung und Puchta, 2001, Hartung et al., 2002; Yin et al., 2002; Corbett und Berger, 2003). In *A. thaliana* bilden TOP6B und SPO11-3 einen Komplex, der an der DNA-Replikation und Endoreplikation beteiligt ist (Hartung et al., 2002).

SPO11-1 und SPO11-2 sind essentielle Faktoren während der meiotischen Rekombination (Grelon et al., 2001; Stacey et al., 2006). Dabei scheinen die Proteine keine redundante Funktion zu besitzen, da *spo11-1*- und *spo11-2*-Mutanten den gleichen Phänotyp zeigen, der sich in einer fehlenden Bivalentbildung und ungleicher Segregation der Homologen äußert (Grelon et al., 2001; Stacey et al., 2006).

In *S. cerevisiae* ist SPO11 die DNA-spaltende Untereinheit eines deutlich größeren Komplexes, der mindestens neun weitere Proteine enthält. Jedes dieser Proteine ist unentbehrlich für die Funktion des Komplexes und die Bildung von DSBs (siehe Review Keeney, 2001); Homologe dieser Proteine (z.B. REC102, REC104 und REC114) scheinen jedoch außerhalb von *S. cerevisiae* und nahe verwandter Hefen nicht konserviert zu sein (Kee und Keeney, 2002; Jiao et al., 2003; Arora et al., 2004; Prieler et al., 2005).

1.4.3.2 BRCA2 als Mediator der homologen Rekombination

In vielen Vertebraten (Moynahan et al., 2001; Tutt et al., 2001; Xia et al., 2001; Hatanaka et al., 2005; Saeki et al., 2006), in Pflanzen (Siaud et al., 2004) in *C. elegans* (Martin et al., 2005) und in *Ustilago maydis* (Kojic et al., 2002) hat sich BRCA2 als wichtiges Element der homologen Rekombination erwiesen. Dabei besitzt das Protein über die Gesamtlänge betrachtet nur eine geringe Homologie zwischen verschiedenen Spezies. Vergleicht man beispielsweise die Sequenzlänge des menschlichen Proteins mit 3418 Aminosäuren (AS) (Tavtigian et al., 1996) mit der des *Caenorhabditis*-Homologen (394 AS) (Martin et al., 2005), so beträgt letzteres nur ca. ein Neuntel der Sequenzlänge von *Hs*BRCA2. *Arabidopsis* enthält zwei Kopien des *BRCA2*-Gens, die auf Chromosom IV und V lokalisiert sind und für Proteine mit 1151 (IV) und 1155 (V) Aminosäuren codieren. Die Identität der beiden Proteinsequenzen beträgt 94,5% (Siaud et al., 2004). Obwohl beträchtliche Unterschiede bezüglich der Gesamtsequenz bestehen, enthalten BRCA2-Proteine unterschiedlicher Arten hoch konservierte Domänen, die ein Protein eindeutig als BRCA2-Homologes ausweisen. Eine dieser konservierten Domänen wird durch sog. BRC-Repeats, die im N-Terminus des Proteins lokalisiert sind, gebildet (Bork et al., 1996; Bignell et al., 1997; Kojic et al., 2002; Takata et al., 2002; Siaud et al., 2004). Trotz der hohen Homologie dieser charakteristischen Domänen kann die Anzahl einzelner Repeats von einem Organismus zum anderen stark variieren. So enthält z.B. das menschliche Protein acht BRC-Repeats (Bork et al., 1996; Bignell et al., 1997; Wong et al., 1997; Chen et al., 1998), *At*BRCA2 vier (Siaud et al., 2004)

und die *C. elegans*- und *U. maydis*-Proteine jeweils nur ein BRC-Repeat (Kojic et al., 2002; Martin et al., 2005). Über diese Repeats interagiert BRCA2 mit RAD51. Gebunden an BRCA2 werden RAD51-Monomere solange in einer inaktiven Form gehalten bis die Zelle ein Signal zur Reparatur eines DNA-Schadens erhält. Der Komplex wird mobilisiert und zur geschädigten Stelle dirigiert (Yu et al., 2003; Min et al., 2007; siehe auch Review Venkitaraman, 2001). Die genaue Funktion der BRC-Repeats während des Beladens der DNA mit dem RAD51-Filament war lange nicht bekannt, da die meisten Daten zur Funktion dieser Domäne aus biochemischen *in vitro*-Experimenten mit isolierten BRC-Repeats stammten. Bei diesen Untersuchungen wird das RAD51-Filament entweder nur an BRC-Repeats gebunden (Galkin et al., 2005) oder die RAD51-Filamentbildung wird unterbrochen (Davies et al., 2001; Pellegrini et al., 2002). Erst nachdem es Shivji et al. (2006) gelungen ist ein Proteinfragment mit allen acht BRC-Repeats des menschlichen Proteins zu isolieren, konnte gezeigt werden, dass eine dreigliedrige Struktur aus BRC-Repeats, RAD51 und einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA besteht. Damit wurde zum ersten Mal experimentell bewiesen, dass BRCA2 tatsächlich die Bildung des RAD51-Nucleoproteinfilaments vermittelt. Mit demselben Proteinfragment konnte die Arbeitsgruppe auch nachweisen, dass die BRC-Repeats den RAD51-abhängigen Strangaustausch katalysieren (Shivji et al., 2006). Der C-Terminus von BRCA2 bindet DNA und fördert den durch RAD51 vermittelten Strangaustausch, indem es Einzelstrang-gebundenes RPA ersetzt (Yang et al., 2005). BRCA2 arbeitet bevorzugt an Einzelstrang- zu Doppelstrang-Übergängen (siehe Review Pâques und Haber, 1999), die charakteristisch an Positionen von Doppelstrangbrüchen zu finden sind.

Als Mediator der homologen Rekombination kommen BRCA2 nicht nur während der somatischen DNA-Reparatur sondern auch während der Meiose wichtige Funktionen zu (Sehorn und Sung, 2004; Sharan et al., 2004; Siaud et al., 2004; Thorslund et al., 2007). Die Untersuchung meiotischer Aufgaben von BRCA2 gestaltet sich in mammalischen Systemen aufgrund der embryonalen Letalität von *brca2*-Mutanten allerdings schwierig (Sharan et al., 2004) oder z.T. unmöglich (Ludwig et al., 1997; Sharan et al., 1997; Suzuki et al., 1997). *A. thaliana* erwies sich diesbezüglich als geeigneter Modellorganismus, da selbst eine *brca2(IV)/brca2(V)*-Doppelnullmutante einen adulten Organismus hervorbringt, der zur Blütenbildung fähig ist. Die Blüten dieser Mutanten sind zwar steril, produzieren jedoch Gameten, die für Untersuchungen der Entwicklung auf meiotischer Ebene verwendet werden können (siehe Ergebnisse, vorliegende Arbeit). Siaud et al. (2004) reduzierten mit Hilfe einer BRCA2-RNAi-Mutanten die Expression von BRCA2. Die Untersuchung männlicher Meiozyten dieser Mutante hat ergeben, dass homologe Chromosomen während der Prophase keine Paarung eingehen und es während der

ersten meiotischen Teilung zu starken Fragmentierungen der Chromosomen kommt (Siaud et al., 2004). Da es vermutlich bereits zu Beginn der Rekombination zu Störungen während des Strangaustausches kommt, kann die Paarung homologer Chromosomen nicht stabilisiert und kein SC ausgebildet werden. Des Weiteren zeigten *BRCA2*-RNAi-Pflanzen eine Beeinträchtigung der Fertilität (Siaud et al., 2004), die auf die gestörte Bildung männlicher Gameten zurückzuführen ist. Mit diesen Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass BRCA2 – zumindest in Pflanzen – eine bedeutende Rolle während der meiotischen Rekombination zukommt.

1.4.3.3 TOP3 α und die Auflösung von Rekombinationsintermediaten

In höheren Eukaryonten gibt es zwei TOP3-Proteine, TOP3 α und TOP3 β . Die Deletion von TOP3 α ist in Mäusen und in *Drosophila* letal, während eine TOP3 β -Deletion zu adulten Organismen mit einer reduzierten Lebenszeit, verminderter Fertilität und einem vermehrten Auftreten von Organschäden führt (Kwan und Wang, 2001; Kwan et al., 2003). Diese unterschiedlichen Phänotypen lassen auf eine Beteiligung der beiden TOP3-Formen in verschiedenen zellulären Funktionen schließen.

Zur Beschreibung der Funktion von TOP3 α muss man einen kleinen Umweg über die Aufgabe eines wichtigen Interaktionspartners gehen. Es handelt sich dabei um BLM (BLOOM SYNDROME PROTEIN), ein Mitglied der RECQ-Helicase-Familie, die an der Suppression der Crossover-Bildung während der Mitose beteiligt ist (Hartung et al., 2000; siehe auch Reviews Hickson, 2003; Mankouri und Hickson, 2004; Hartung und Puchta, 2006; Sharma et al., 2006). Das Protein BLM erhielt seine Bezeichnung aufgrund einer autosomal rezessiven Krankheit, die durch Mutationen innerhalb von BLM entsteht und die Betroffenen für die Entstehung verschiedener Krebsformen prädisponiert – das Bloom's Syndrom (BS) (siehe Reviews Sullivan und Willis, 1992; Digweed, 1993; Watt und Hickson, 1996). BS-Patienten zeigen eine erhöhte Instabilität des Genoms und einen Anstieg der HR-Rate während der Mitose, was sich in einem vermehrten Austausch von Schwesterchromatiden äußert (German, 1964; Chaganti et al., 1974; German et al., 1974).

BLM unterdrückt die Entstehung von Crossover, möglicherweise, in dem die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in den Mechanismus des SDSA gelenkt wird. Dies geschieht zum einen durch Auflösung der D-Loop-Struktur, die während frühen Schritten des HR-Prozesses entsteht, und zum anderen durch Auflösung von dHJ während späten Phasen der HR

in Zusammenarbeit mit weiteren Faktoren (Karow et al., 2000; van Brabant et al., 2000; Wu und Hickson, 2003), unter anderem TOP3 α . TOP3 α ist eine TypIA-Topoisomerase, ein Enzym, das einzelsträngige DNA-Bereiche spaltet und negativ superhelikale DNA entspannt. Die Funktion des BLM-TOP3 α -Komplexes ist bis heute noch weitgehend unbekannt, doch lässt die Fähigkeit des Komplexes, *in vitro* dHJ-Substrate aufzulösen, auf einen Mechanismus zur Vermeidung von Crossover während Rekombinationsprozessen schließen (Wu und Hickson, 2003; Plank et al., 2006). Diese Vermutung wird durch Untersuchungen orthologer RECQ-Komplexe verschiedener Modellorganismen, wie der Bäckerhefe (SGS1-TOP3), der Spaltheefe (RQH1-TOP3) und *Drosophila*, unterstützt (Gangloff et al., 1994; Watt et al., 1995; Oakley et al., 2002; Ira et al., 2003; Win et al., 2004; Hope et al., 2006; Plank et al., 2006). In *Saccharomyces cerevisiae* ist SGS1 die einzige RECQ-Helicase, fehlt diese, kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Crossover-Bildung (Ira et al., 2003), vergleichbar dem Phänotyp einer BLM-Mutation beim Menschen. SGS1 wurde ursprünglich als Suppressor des TOP3-Phänotyps in Hefe entdeckt, der durch ein verzögertes Wachstum der Hefezellen charakterisiert ist (Wallis et al., 1989; Gangloff et al., 1994).

Der BLM-TOP3 α - bzw. SGS1-TOP3-Komplex steht in enger Assoziation mit einem weiteren Faktor, der die Resolvase-Aktivität des Komplexes deutlich steigert (Raynard et al., 2006; Wu et al., 2006; Bussen et al., 2007; Chen und Brill, 2007). Es handelt sich dabei um das Protein BLAP75/RMI1 (75 kDa BLM-ASSOCIATED PROTEIN / RECQ MEDIATED GENOME INSTABILITY 1) (Chang et al., 2005; Mullen et al., 2005; Yin et al., 2005; Raynard et al., 2006; Wu et al., 2006; Chen und Brill, 2007). Wie an *S. cerevisiae* gezeigt wurde, erfolgt die Aktivierung des Komplexes möglicherweise durch Förderung der Fähigkeit von TOP3 superhelikale DNA zu entspannen und der Erhöhung der ssDNA-Bindeaktivität von TOP3 (Chen und Brill, 2007). Bachrati und Hickson (2003) schlagen ein Modell zur Funktionsweise des SGS1-TOP3-Komplexes vor, das die konvergente „Branch migration“ der beiden HJ vorsieht und so zur Auflösung des dHJ-Intermediates führt. Durch diese Aktivität entstehen ausschließlich NCOs (Bachrati und Hickson, 2003).

Die Beteiligung von TOP3 α an der Auflösung von dHJ lässt vermuten, dass dem Protein auch eine Rolle während der meiotischen HR zukommen könnte. Gangloff et al. konnten bereits 1999 an Hefestudien zeigen, dass *top3 Δ* -Linien nicht in der Lage sind lebensfähige Sporen zu bilden. Die Deletionsmutanten sind zwar fähig, die ersten Schritte der Rekombination auszuführen, die Meiose kommt jedoch nach der Bildung von Rekombinationsintermediaten zum

Stillstand (Gangloff et al., 1999). Wahrscheinlich ist die Letalität von *top3 α* -Mutanten (Li und Wang, 1998) der Grund dafür, dass es bisher keine vergleichbaren Ergebnisse über eine meiotische Funktion von TOP3 α in höheren Eukaryonten gibt.

1.5 PAARUNG UND SYNAPSIS HOMOLOGER CHROMOSOMEN

Barbara McClintock postulierte bereits 1933, dass Chromosomen während der meiotischen Prophase die Tendenz zur paarweisen Zusammenlagerung zeigen: „there is a tendency for chromosomes to associate 2-by-2 in the prophase of meiosis“. Homologe Chromosomen müssen dazu zunächst die weitläufige Trennung innerhalb des Nukleus überwinden und in räumliche Nähe gebracht werden. Es findet ein Homologie-Abgleich zwischen den interagierenden Molekülen statt. Wie diese Annäherung der Homologen funktioniert ist das bisher am wenigsten verstandene Stadium der meiotischen Prophase.

Wie bereits erwähnt, ist es heute eine weit verbreitete Annahme, dass eine Abhängigkeit zwischen der Paarung der Homologen und der meiotischen Rekombination besteht. Die genaue Koordination zwischen Synapsis und Rekombination ist von Organismus zu Organismus etwas unterschiedlich. So sind in einigen Organismen, wie *S. cerevisiae*, *Sordaria macrospora*, *Coprinus cinereus*, *Mus musculus* und *A. thaliana*, Chromosomenpaarung und Synapsis von der DSB-Initiation und der Anwesenheit von Rekombinationsproteinen abhängig (Bishop et al., 1992; Rockmill et al., 1995; Pittman et al., 1998; Yoshida et al., 1998; Baudat et al., 2000; Celerin et al., 2000; Gerecke und Zolan, 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000; Grelon et al., 2001; Li et al., 2004; Peoples-Holst und Burgess, 2005). Dagegen finden in *C. elegans* und *D. melanogaster* Paarung und Synapsis auch in Mutanten ohne DSB-Initiation statt (Dernburg et al., 1998; McKim et al., 1998). Zumindest in *C. elegans* verlaufen jedoch Synapsis und Rekombination nicht völlig unabhängig voneinander, da eine vollständige Ausbildung des SC für die Vollendung der Rekombination wichtig ist (Colaiácovo et al., 2003). Bis heute sind die Details des Zusammenspiels von Chromosomenpaarung, Synapsis und der Initiation der meiotischen Rekombination nicht vollständig geklärt.

1.5.1 Die prämeiotische Phase

Meiotische Zellen können bereits während der G1-Phase von somatischen Zellen unterschieden werden, da sie zwar kleiner sind als S-Phase-Zellen, jedoch größer als die sie umgebenden somatischen Zellen. Meiotische S-Phase-Zellen zeichnen sich durch einen deutlich vergrößerten Nukleolus und dekondensierten pericentromeren Heterochromatinbereichen aus (Armstrong und Jones, 2003) (Abb. 10). Im Vergleich zur mitotischen S-Phase nimmt die meiotische S-Phase einen längeren Zeitraum in Anspruch (John, 1990).

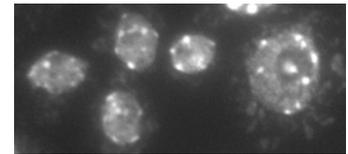


Abb. 10: Meiotische S-Phase-Zelle im Vergleich zu somatischen Zellen

Während der prämeiotischen S-Phase sind die frisch replizierten Schwesterchromatiden über einen Multiprotein-Cohesin-Komplex miteinander verbunden (Cai et al., 2003; Eijpe et al., 2003; Mercier et al., 2003; Revenkova et al., 2004; Milutinovich et al., 2007). Der Cohesin-Komplex ist ringförmig und besteht aus drei Kernfaktoren, REC8/RAD21, SMC (STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES) 1 und SMC3, mit denen weitere Proteine assoziiert sind (Watanabe und Nurse, 1999; Eijpe et al., 2003; Gruber et al., 2003; Weitzer et al., 2003; Revenkova et al., 2004; Milutinovich et al., 2007; siehe auch Review Nasmyth, 2002). In Hefe ist RAD21/SCC1 (SISTER CHROMATID COHESION 1) Bestandteil des mitotischen Cohesin-Komplex und wird während der Meiose größtenteils durch REC8 ersetzt (Michaelis et al., 1997; Parisi et al., 1999; Watanabe und Nurse, 1999; Tomonaga et al., 2000). Pflanzliche Homologe von REC8/RAD21 sind SYN1/DIF1 (SYNAPSIS 1 / DETERMINATE INFERTILE 1) und AFD1 (ABSENCE OF FIRST DIVISION 1). Es wurde gezeigt, dass diesen Proteinen eine wichtige Funktion während der Meiose zukommt (Bai et al., 1999; Bhatt et al., 1999; Cai et al., 2003; Golubovskaya et al., 2006). Es ist jedoch nicht bekannt, ob auch in Pflanzen eine klare Unterscheidung zwischen mitotischem und meiotischem Cohesin-Komplex getroffen werden kann. So existieren von SYN1 zwei Transkripte, die durch alternative Promotoren erzeugt werden und von denen eines in den meisten Geweben exprimiert wird, während das zweite ausschließlich in Blütenknospen zu finden ist (Bai et al., 1999). Im Gegensatz zu anderen höheren Eukaryonten gibt es in Pflanzen keine echte Keimbahn; möglicherweise treten dadurch Differenzen zu anderen Organismen auf.

1.5.2 Paarung meiotischer Chromosomen und SC-Bildung

Die Zusammenlagerung homologer Chromosomen ist für eine erfolgreiche Segregation während der ersten meiotischen Teilung von entscheidender Bedeutung. Sie läuft während der meiotischen Prophase in drei aufeinander folgenden Schritten ab: die Erkennung der Homologen, die präsynaptische Ausrichtung (Paarung) und die Bildung des synaptonemalen Komplexes. Zunächst findet eine Erkennung homologer Chromosomen statt, unabhängig von Rekombinationsprozessen. Anschließend erfolgt die Annäherung der Homologen auf eine Distanz von 400 nm über lokale Verbindungen. Schließlich findet die Initiation der SC-Bildung an einer kleinen Menge an DSBs statt und entfaltet sich von hier aus weiter. Die Homologen müssen sich dazu auf eine Distanz von 100 nm zusammengeschlossen haben (siehe Review Zickler, 2006).

Entdeckt wurde der synaptonemale Komplex von Moses und Fawcett, die zeitgleich im Jahr 1956 die Existenz dieser meiotischen Struktur veröffentlichten. Im Folgenden sollen alle Prozesse zur Verknüpfung der Homologen, die vor der Bildung des SC ablaufen, als *Paarung* und die Verbindung der Homologen während und nach der SC-Bildung als *Synapsis* bezeichnet werden.

Homologe Chromosomen des Pilzes *Sordaria* sind während des frühen Leptotäns noch relativ weit voneinander entfernt und nehmen nur wenig Kontakt zueinander auf. Bereits während des mittleren Leptotäns treten die Homologen in Kontakt und es findet eine erste, weiträumige Ausrichtung statt, die tendenziell an den Telomeren beginnt, jedoch auch interstitiell entstehen kann. In *Sordaria* haben sich am Ende des Leptotäns alle homologen Chromosomen auf eine Distanz von 400 nm angenähert und entlang der Achsen ausgerichtet (siehe Review Zickler, 2006). Eine vollständige Paarung vor der SC-Bildung findet auch in einigen Pilzen (*Neurospora*, *Coprinus*) und in höheren Pflanzen statt (Pukkila und Lu, 1985; Bojko, 1989; Zickler et al., 1992; Lu, 1993; Tessé et al., 2003; Bowring et al., 2006; siehe auch Reviews Loidl, 1990; Zickler und Kleckner, 1999; Zickler, 2006). Diese Annäherung homologer Chromosomen wird wahrscheinlich durch Rekombinationsfaktoren wie z.B. RAD51, DMC1, RPA oder MSH4 (MutS-Homologes 4) stabilisiert (z.B. Bishop et al., 1992; Rockmill et al., 1995; Soustelle et al., 2002; Higgins et al., 2004). In *Saccharomyces cerevisiae* und in Säugetieren findet eine stellenweise Paarung der Homologen zeitgleich zur Initiation der Synapsis statt (siehe Reviews Zickler und Kleckner, 1999; Zickler, 2006). Wie die Chromosomenpaarung findet auch die Initiation der SC-Bildung bevorzugt an Telomeren statt, sie kann jedoch auch hier an verschiedenen interstitiellen

Stellen beginnen (Holm et al., 1977; Rasmussen et al., 1981; Holm et al., 1982; Abirached-Darmency et al., 1983; Hasenkampf, 1984; von Wettstein et al., 1984; Gillies, 1985; Stack und Anderson, 1986; Barlow und Hultén, 1996; Armstrong et al., 2001). Wobei Unterschiede zwischen verschiedenen Arten bekannt sind. So beginnt die Synapsis in vielen Pflanzenarten fast ausschließlich an Telomeren und nur sehr selten innerhalb des Chromosoms (Stack und Anderson, 2002). Daher sind späte Rekombinationsknoten, die Regionen, die als Initiationsstellen der SC-Bildung gelten (Henderson und Keeney, 2004), in Pflanzen hauptsächlich in Telomerbereichen zu finden (Stack und Anderson, 2002).

1.5.3 Die Abhängigkeit zwischen Synapsis und Rekombination

Trotz der hohen Sequenzhomologie zwischen SPO11-Proteinen verschiedener Organismen gibt es zwei Formen der Abhängigkeit von Paarung, Synapsis und Rekombination (Lichten, 2001; siehe auch Review Villeneuve und Hillers, 2001). Bei Pilzen (*Saccharomyces*, *Coprinus* und *Sordaria*), in *Arabidopsis thaliana* und in der Maus ist die katalytische Funktion von SPO11 für eine vollständige Paarung und Synapsis essentiell (Keeney et al., 1997; Baudat et al., 2000; Celerin et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000; Grelon et al., 2001; Storlazzi et al., 2003; Stacey et al., 2006). Auch in der Spaltheife ist SPO11/REC12 für eine normale Paarung erforderlich, obwohl in diesem Organismus keine SCs gebildet werden (Bähler et al., 1993; Sharif et al., 2002). Dagegen beginnt in *D. melanogaster* und in *C. elegans* die SC-Bildung von „Paarungszentren“ aus, womit SCs auch ohne das Einbringen von Doppelstrangbrüchen entstehen können (Sherizen et al., 2005; siehe auch Review Schwarzacher, 2003). Paarungszentren erfüllen zwei Funktionen: die Stabilisierung der Paarung unabhängig vom SC und die Initiation der SC-Polymerisation von diesen Zentren aus (MacQueen et al., 2005). Weder in *Drosophila*-Weibchen noch in *C. elegans* sind Paarungszentren jedoch ausreichend um die Paarung der Homologen zu stabilisieren (MacQueen et al., 2005; Sherizen et al., 2005). Entlang der X-Chromosomen sind weder für Paarung noch für Synapsis und Crossover-Bildung Paarungszentren erforderlich (MacQueen et al., 2005; Martinez-Perez und Villeneuve, 2005). Innerhalb der DSB-unabhängigen SC-Bildung kann zwischen zwei Wegen unterschieden werden: In *C. elegans* finden normalerweise Rekombinationsprozesse und Chiasmata-Bildung statt, was eine gleichmäßige Segregation der Homologen während der ersten Reduktionsteilung sichert. Allerdings sind Mutanten, die keine DSBs produzieren können, dennoch in der Lage die Paarung

homologer Chromosomen und die Ausbildung des SC auszuführen, zeigen jedoch eine gestörte Chromosomensegregation (Dernburg et al., 1998). Die gleiche Situation ist bei *Drosophila*-Weibchen anzutreffen (McKim et al., 1998). Dagegen findet bei *Bombyx mori* und *D. melanogaster*-Männchen eine völlig achiasmate Segregation der Chromosomen statt (Rasmussen, 1977; von Wettstein et al., 1984; Vasquez et al., 2002). Bei diesen Organismen werden die Homologen bereits durch prämeiotische Paarung effizient zusammengehalten (Vasquez et al., 2002).

In *S. cerevisiae*, Mäusen und Mais ist bereits für die Paarung homologer Chromosomen das Vorhandensein der Rekombinationsproteine RAD51 und DMC1 notwendig (Rockmill et al., 1995; Yoshida et al., 1998; Couteau et al., 1999; Pawlowski et al., 2003). RAD51- und DMC1-Foci erscheinen während des mittleren Leptotäns auf und zwischen den Achsen homologer Chromosomen (Bishop, 1994; Terasawa et al., 1995; Ashley et al., 1995; Plug et al., 1996; Barlow et al., 1997; Franklin et al., 1999; Tarsounas et al., 1999). Bereits zu Beginn des Pachytäns sind diese RAD51/DMC1-Körperchen nicht mehr zu sehen (Bishop, 1994; Franklin et al., 1999; Tarsounas et al., 1999).

Aus Hefe-Studien (z.B. Padmore et al., 1991; Schwacha und Kleckner, 1995; Gilbertson und Stahl, 1994; Hunter und Kleckner, 2001) konnte die folgende Reihenfolge für DSB-Bildung, Rekombination und Chromosomenpaarung aufgestellt werden: DSBs erscheinen während des Leptotäns, also lange vor der Bildung des SC. Während des Zygotäns findet die Single-End-Invasion, zeitgleich zur Initiation der SC-Bildung statt. Während des mittleren Pachytäns dringt auch der zweite Einzelstrang ins homologe Chromosom ein und bildet eine dHJ. Dies geschieht jedoch erst nachdem der SC fertig ausgebildet ist. In der Bäckerhefe (z.B. Padmore et al., 1991; Schwacha und Kleckner, 1995; Hunter und Kleckner, 2001) und in der Maus (Guillon et al., 2005) können reife Crossover-Produkte während des mittleren bis späten Pachytäns beobachtet werden.

In Hefe ist der ZMM-Proteinkomplex (ZIP1 bis 3, ZIP4/SPO22, MER3, MSH4, MSH5) Hauptkomponente der SC-Initiationsstelle. ZIP1 gewährleistet eine stabile Verknüpfung homologer Chromosomen, während ZIP2 bis 4 die Interaktion mit weiteren Proteinen vermitteln. MER3, MSH4 und MSH5 sind direkt am Rekombinationsmechanismus beteiligt (Sym et al., 1993; Hollingsworth et al., 1995; Chua und Roeder, 1998; Tung und Roeder, 1998; Nakagawa und Ogawa, 1999; Agarwal und Roeder, 2000; Novak et al., 2001; Fung et al., 2004; Mazina et al., 2004; Snowden et al., 2004; Chen et al., 2005; Tsubouchi et al., 2006; Chelysheva et al., 2007; siehe auch Review Lynn et al., 2007).

1.5.4 Die Bouquet-Struktur

Das Bouquet ist eine hoch-konservierte meiotische Struktur, die während der mittleren Prophase gebildet wird und eine wichtige Rolle bei der Annäherung homologer Chromosomen spielt. Es wird vermutet, dass die Bouquet-Struktur den anfänglichen Kontakt für die Paarung der Telomere ermöglicht (Scherthan et al., 1996; Bass et al., 2000). Die Telomere werden dabei in einem aktiven Prozess entlang der Kernhülle bewegt. Diese Bewegung wird wahrscheinlich durch das Cytoskelett gesteuert (Bass et al., 1997; Carlton et al., 2003).

Es gibt einige gemeinsame Eigenschaften zwischen den Bouquet-Strukturen verschiedener Organismen:

[1] Die Telomer-Regionen sind während des frühen Leptotäns mit der Kernhülle assoziiert und über die Kernperipherie verteilt (z.B. Scherthan et al., 1996).

[2] Die Chromosomenenden gruppieren sich innerhalb eines bestimmten Bereiches, der in vielen Organismen dem sog. Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC, microtubule organizing centre) entspricht (Sheldon et al., 1988; Jin et al., 2002; siehe auch Reviews Loidl, 1990; Zickler und Kleckner, 1998).

[3] Während des späten Leptotäns beginnen sich die Chromosomenenden zu gruppieren (Martínez-Pérez et al., 1999; Bass et al., 2000; Pfeifer et al., 2001). Dies verläuft schrittweise, beginnend mit einer Telomer-Region. Anschließend ordnen sich sämtliche Chromosomenenden in Untergruppen an, bis sich schließlich während des Übergangs von Leptotän zu Zygotän eine lockere Bouquet-Struktur gebildet hat (Carlton et al., 2003; siehe auch Review Zickler, 2006). Time-laps-Studien an *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass sich während bestimmten Stadien der Meiose, dem Übergang vom Leptotän zum Zygotän und zu Beginn des Pachytäns, die Chromosomen aus dem Bouquet heraus und wieder hinein bewegen können (Trelles-Sticken et al., 2005). Dennoch handelt es sich bei der Bouquet-Struktur um ein relativ stabiles Gebilde, das sich erst während des mittleren Pachytäns wieder zu lockern beginnt. Auch die Auflockerung des Bouquets erfolgt schrittweise, beginnend mit einem Telomere bis schließlich alle Chromosomenenden wieder über die Peripherie der Kernülle verteilt sind (siehe Review Zickler, 2006).

[4] Zur Bouquet-Bildung sind weder Doppelstrangbrüche noch die folgenden Prozesse der Rekombination und SC-Bildung erforderlich (Trelles-Sticken et al., 1999; Storlazzi et al., 2003). Allerdings sind DSBs oder Rekombinationsprozesse notwendig, damit sich die Bouquet-Struktur

wieder auflösen kann. Sind keine DSBs vorhanden, läuft die Auflösung der Bouquet-Struktur deutlich verlangsamt ab (Storlazzi et al., 2003).

Über die genaue Funktion der Bouquet-Struktur kann bis heute nur spekuliert werden. Zum Teil wird argumentiert, dass sie möglicherweise zur Anordnung homologer Chromosomen und Stabilisierung der Paarung beiträgt, da die Homologen in räumlicher Nähe gehalten werden (Scherthan et al., 1996; Bass et al., 2000; siehe auch Review Scherthan, 2001). In *Sordaria* und Roggen findet die Zusammenlagerung jedoch bereits vor der Bouquet-Bildung statt, Beobachtungen, die gegen diese Theorie sprechen (Nogouchi, 2002; Storlazzi et al., 2003).

Interessanterweise scheint sich in *A. thaliana* keine Bouquet-Struktur auszubilden; sie wird durch die Assoziation der Chromosomenenden mit dem Nukleolus ersetzt (Armstrong et al., 2001). Die Kernhülle fungiert bei Pflanzen als MTOC, daher ist es möglich, dass hier Mikrotubuli, die mit der Kernhülle assoziiert sind, an der Telomerbewegung beteiligt sind (siehe Review Hamant et al., 2006).

Die Entstehung von Gameten, insbesondere die meiotische Phase, ist ein komplexer Prozess, der bis heute noch viele Fragen offen lässt. Es wurden verschiedene Bereiche dargestellt, die eine Möglichkeit bieten sich der meiotischen Entwicklung von Gameten zu nähern; sei es das Verhalten der Chromosomen während meiotischer Teilungsprozesse, Mechanismen zur Homologiefindung und –stabilisierung oder Prozesse während der meiotischen Rekombination. Die vorliegende Arbeit wird sich vor allem mit dem letzten Aspekt beschäftigen – der homologen Rekombination, die ein essentieller Abschnitt während der Meiose darstellt. Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden, sollen durch cytologische und cytogenetische Methoden untersucht werden.

1.6 ZIEL DER ARBEIT

In den letzten Jahrzehnten konnte eine Vielzahl an Erkenntnissen über die Mechanismen, die der meiotischen Rekombination zugrunde liegen, gewonnen werden. Dennoch gibt es viele offene Fragen, die es zu beantworten gilt, um ein vollständiges Bild dieses komplexen Prozesses zu erhalten. Zur Erforschung meiotischer Vorgänge hat sich *Arabidopsis thaliana* aufgrund seines komplett sequenzierten Genoms und der kurzen Generationszeit als nützlicher Modellorganismus erwiesen. Außerdem sind viele Mutanten mit defekten Rekombinationsfaktoren zwar steril, können im Gegensatz zu tierischen Modellsystemen jedoch einen adulten Organismus hervorbringen, wodurch die Untersuchung von Proteinen mit Beteiligung an der meiotischen Rekombination direkt an Keimzellen durchgeführt werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, aufzuzeigen, welche Störungen in T-DNA-Insertionslinien von SPO11-1, SPO11-2, BRCA2 und TOP3 α durch das Ausschalten dieser Proteine während der Meiose entstehen und welche Informationen man aus der Art des Defektes über die Funktion dieser Faktoren ableiten kann. Dazu sollten Gameten der entsprechenden Mutanten DIC- und Fluoreszenz-mikroskopisch untersucht werden. Da sich BRCA2 als wichtiger Mediator der homologen Rekombination erwiesen hat, sollte zudem gezeigt werden, ob das Protein in *A. thaliana* auch einen Einfluss auf die somatische Reparatur von DNA-Schäden hat.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Modellorganismen und Mutanten

Modellorganismus

Arabidopsis thaliana Wildtyp, Ökotyp Columbia (Col-0)

Mutanten

Arabidopsis thaliana brca2 (IV), T-DNA-Insertionslinie GABI_290C01, Ökotyp Col-0

Arabidopsis thaliana brca2 (V), T-DNA-Insertionslinie SALK_037617, Ökotyp Col-0

Arabidopsis thaliana spo11-1-3, T-DNA-Insertionslinie SALK_146172, Ökotyp Col-0

Arabidopsis thaliana spo11-2-3, T-DNA-Insertionslinie GABI_749C12, Ökotyp Col-0

Arabidopsis thaliana top3 α -2, T-DNA-Insertionslinie GABI_476A12, Ökotyp Col-0

Arabidopsis thaliana rad51, T-DNA-Insertionslinie GABI_134A01, Ökotyp Col-0

2.1.2 Medien und Lösungen

Medien

GM (germination medium)

Murashige & Skoog mit Vitaminen und MES,

Fertigmedium (Duchefa) 4,9 g/l

Saccharose 10 g/l

Difco-Agar 8 g/l

pH 5,7 mit KOH

Lösungen

Shorty-Extraktionspuffer

- 0,2 M Tris-HCl, pH 9,0
- 0,4 M LiCl
- 25 mM EDTA
- 1% SDS

FAA-Fixierlösung

- 3,7% Formaldehyd
- 5% Essigsäure
- 50% Ethanol

Citratpuffer

- 0,1 M Natriumcitrat 12 ml
- 0,1 M Zitronensäure 8 ml
- ddH₂O 180 ml
- pH 4,8 mit 0,1 M Zitronensäure

Pektinase-Cellulase-Enzym-Mix (10x-Stock)

- 20% (w/v) Pektinase von *Aspergillus niger* in 40% Glycerol
- 2% Cellulase
- in Citratpuffer, pH 4,8

TE-Puffer

- Tris-HCl 1,21 g/l
- EDTA 372 mg/l
- pH 8,0 mit HCl

50xTAE-Puffer für Gelelektrophorese

- Tris 242 g/l
- Eisessig 57,1 ml
- 0,5 M EDTA 100 ml
- pH 8,0

2.1.3 Enzyme und Chemikalien

Enzyme

Pektinase-Lösung von *Aspergillus niger*, wässrige Glycerin-Lösung ≥ 5 Units/mg Protein (Lowry) (Sigma #P4716), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niederlassung D-30926 Seelze

Cellulase von *Trichoderma viride*, Pflanzenzellkultur erprobt, 3-10 Units/mg fest (Sigma #C1794), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niederlassung D-30926 Seelze

Biomaster Taq-DNA-Polymerase, Biomaster GmbH, 51570 Windeck

10x-Amplifikationspuffer (mit $MgCl_2$)

10x-Amplifikationspuffer (ohne $MgCl_2$)

50 mM $MgCl_2$

TaKaRa Ex TaqTM DNA-Polymerase, TaKaRa Bio USA, Madison, WI D-53719

10x TaKaRa Ex TaqTM Mg^{2+} -Puffer

dNTP Mixture

Deoxyribonuclease I (RNase-frei), MBI Fermentas, Vertrieb D-68789 St. Leon-Rot

10x Reaktions-Puffer mit $MgCl_2$, MBI Fermentas, Vertrieb D-68789 St. Leon-Rot

RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, Vertrieb D-68789 St. Leon-Rot

RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase, 5x M-MuLV Reaction Buffer

Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)

Oligo (dT) Primer

10 mM dNTP Mix

iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories, Niederlassung D-80939 München

Chemikalien und Kits

VECTASHIELD mounting medium mit 1,5 μ g/ml DAPI, Vector Laboratories, Vertrieb

AXXORA Deutschland GmbH, D-79839 Lörrach

Murashige & Skoog mit Vitaminen und MES, Duchefa Biochemie, 2003 RV Haarlem,

Niederlande

Bleomycinsulfat, Duchefa Biochemie, 2003 RV Haarlem, Niederlande

Mitomycin C, Duchefa Biochemie, 2003 RV Haarlem, Niederlande

8-Hydroxychinolin, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe

Paraffinöl, dünnflüssig, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe

Ethylbenzoat, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe

Aceton, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe

Formaldehyd 37%, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe

Essigsäure, 96%, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe

Natriumhypochloritlösung, 12%, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe

RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, D-40724 Hilden

High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim

2.1.4 Geräte

Pflanzenarbeiten

Percival Scientific CU-36L4, CFL Plant Climatics GmbH, D-86494 Emersacker

Ehret Et 130 V Sicherheitswerkbank, Ehret, D-79312 Emmendingen

Reinraumbank Typ HF, BDk Luft- und Reinraumtechnik GmbH, D-72820 Sonnenbühl-
Genkingen

Reinraumbank Typ KVF, BDk Luft- und Reinraumtechnik GmbH, D-72820 Sonnenbühl-
Genkingen

captair bio, ERLAB D.F.S., Niederlassung Deutschland D-50519 Köln

eppendorf Thermomixer compact, eppendorf Deutschland

Gelelektrophorese:

Biozym Consort E132 Spannungsgerät, D - 31833 Hess. Oldendorf

Biozym ComPhor L Maxi, Midi und Mini Elektrophoresekammern mit Zubehör, D - 31833
Hess. Oldendorf

Bio-Rad PowerPac Basic und PowerPac 300, Bio-Rad Laboratories, Niederlassung D-80939
München

Bio-Rad Mini-Sub Cell GT, Wide Mini-Sub Cell GT und Mini-SubTM DNA CELL, Bio-Rad
Laboratories, Niederlassung D-80939 München

peQLab Photodokumentationssystem, peQLab Biotechnologie GmbH, Vertrieb, D-91052-
Erlangen

Mitsubishi P91 Photoprinter, 460 06 Liberec 6, Tschechien

PCR-Maschinen

iCycler iQ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, Niederlassung D-80939 München

iCycler Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Niederlassung D-80939 München

Biometra T personal PCR, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, D-37079 Göttingen

Mikroskope

Olympus-SZX12-Binokular; ColorView Soft Imaging System, Olympus Deutschland GmbH D-20097 Hamburg

ZEISS AxioImager.M1; ZEISS AxioCam MR, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D-37081 Göttingen - Vertrieb Deutschland

ZEISS Axioskop 2 FS; ZEISS AxioCam, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D-37081

2.1.5 Spezielle Software und Datenbanken

Software

AxioVision Versionen 4.3 und 4.6

iCycler™ iQ Optical System Software Version 3.0a, Bio-Rad Laboratories

DNASTAR 5.0, Lasergene

Datenbanken

TAIR – The Arabidopsis Information Resource¹

NCBI – National Center for Biotechnology Information²

SIGnAL – Salk Institute Genomic Analysis Laboratory³

¹ <http://arabidopsis.org>

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

³ <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

2.1.6 Primer

Screening

BRCA2(IV)

WT: Primer 1: 5'-ATT AGA TAG ACA GTG AGT ATT G-3'

Primer 2: 5'-AGG AAA CCT CAA GTG GTG AT-3'

T-DNA-Insertion: Primer 1: 5'-CCA AGG TAA ACG GTT TCA TTC-3'

Primer 2: 5'-GAC CAT CAT ACT CAT TGC TG-3'

BRCA2(V)

WT: Primer 1: 5'-ATT TTT TAC ACC ACA GAA AGA TGA AAG GCT-3'

Primer 2: 5'-CTA AAA CCA CCT CGT AAA TGT GTT TGA GTG-3'

T-DNA-Ins.: Primer 1: 5'- ATT TTT TAC ACC ACA GAA AGA TGA AAG GCT-3'

Primer 2: 5'-TTG GAC GTG AAT GTA GAC AC-3'

SPO11-1

WT: Primer 1: 5'-GTG TAG TCG GTA CAA CTT G-3'

Primer 2: 5'-GCC ATA TGG ATC ACA GTC G-3'

T-DNA-Insertion: Primer 1: 5'-GTG TAG TCG GTA CAA CTT G-3'

Primer 2: 5'-TCG GAA CCA CCA TCA AAC AG-3'

SPO11-2

WT: Primer 1: 5'-TCC TGA TCT GCC AAT TCT TG-3'

Primer 2: 5'-CCA TGA CAA TAG AGA GCT TC-3'

T-DNA-Insertion: Primer 1: 5'-TCC TGA TCT GCC AAT TCT TG-3'

Primer 2: 5'-TTG GAC GTG AAT GTA GAC AC-3'

TOP3 α

WT: Primer 1: 5'-CAT TAC CTA GCA TGT GTT TC-3'

Primer 2: 5'-GAA AAC CGT GTA TTA GCA TC-3'

T-DNA-Insertion: Primer 1: 5'-CAT TAC CTA GCA TGT GTT TC-3'

Primer 2: 5'-GAC CAT CAT ACT CAT TGC TG-3'

Expressionsanalyse

β -Tubulin-Kontrolle

Primer 1: 5'-CCT GAT AAC TTC GTC TTT GG-3'

Primer 2: 5'-GTG AAC TCC ATC TCG TCC AT-3'

BRCA2(IV)/BRCA2(V)-N-Terminus

Primer 1: 5'-CTT CAG TCC GTC TCG GAT TC-3'

Primer 2: 5'-TGG AAT TAT TCA CTG CCA TAT C-3'

BRCA2(IV)/BRCA2(V)-Mitte

Primer 1: 5'-GAT ATG GCA GTG AAT AAT TCC A-3'

Primer 2: 5'-TCT GTA TGT CCC ATT AAT ATT C-3'

BRCA2(IV)/BRCA2(V)-C-Terminus

Primer 1: 5'-GTA TTA TGT GTG AGT ACC AGA-3'

Primer 2: 5'-GGT GAG AAG AGT AGG CAG CTT CT-3'

Real-time PCR

β-Tubulin-Kontrolle (s. oben)

BRCA2(IV)/BRCA2(V)

Primer 1: 5'-CAG CAT GGA TTA TGT GCC AGA CCA T-3'

Primer 2: 5'-TCG TAG CAT GCA AGT TTC CAG ACT-3'

2.2 METHODEN

2.2.1 Pflanzenarbeiten

2.2.1.1 Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen

Für die Aufzucht, Vermehrung und Kreuzungen von Pflanzen wurden Samen von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-0) auf Erde ausgesät und bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 Stunden bei 23-24°C kultiviert. Für axenische Wachstumsbedingungen wurde eine Oberflächensterilisation (siehe unten) der Samen durchgeführt und die Samen anschließend auf GM-Medium ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in einem Anzuchtschrank (Percival Scientific CU-36L4) unter den oben genannten Bedingungen.

2.2.1.2 Oberflächensterilisation

Samen von *A. thaliana* wurden für sieben Minuten in 6% Natrium-Hypochlorit-Lösung mit 0,1% Tween®20 inkubiert und anschließend vier Mal in sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Samen in 0,1% Agarose-Lösung resuspendiert und bis zur Aussaat am nächsten Tag bei 4°C kältestratifiziert.

2.2.1.3 Extraktion genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA wurde ein Blatt einer Pflanze entfernt und in 400 µl Shorty-Extraktionspuffer zermörsert. Blattreste wurden bei 12000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. 350 µl des Überstandes wurden mit dem gleichen Volumen Isopropanol in einem neuen Reaktionsgefäß gemischt, einige Male invertiert und 2 Minuten stehen gelassen. Die gefällte DNA wurde anschließend bei 14000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das verbleibende Pellet ca. 15 Minuten luftgetrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer, pH 8,0 gelöst und als Template für PCRs verwendet.

2.2.1.4 Screening nach homozygoten Mutanten

Das Screening nach hetero- bzw. homozygoten Mutanten erfolgte mittels PCR mit 1 µl genomischer DNA unter Verwendung der unter Kapitel 2.1.6 aufgeführten Primerpaare.

2.2.1.5 Sensitivitätstests

Samen von *A. thaliana* Wildtyp und T-DNA-Insertionslinien wurden oberflächensterilisiert und auf GM-Medium ausgesät, das 0 µg, 5 µg oder 10 µg Mitomycin C bzw. 1 µg oder 2 µg Bleomycin enthielt. Nach drei Wochen Wachstum unter den oben genannten Bedingungen wurde die Anzahl der Blätter von 80-90 Pflanzen ausgezählt und das Frischgewicht bestimmt.

2.2.1.6 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*-Linien

Zur Kreuzung verschiedener *A. thaliana*-Linien wurden Kelchblätter, Blütenblätter und Staubblätter von Blüten der Mutterpflanze entfernt. Auf der Narbe des zurückbleibenden Fruchtblattes wurde der Blütenstaub der Vaterpflanze abgestreift und die präparierten und bestäubten Fruchtblätter markiert. Somit konnten Schoten, die sich aus Kreuzungen entwickelten, von eventuell nachwachsenden Wildtrieben unterschieden werden.

2.2.1.7 RNA-Extraktion und Reverse Transkription

Die Extraktion erfolgte mittels RNeasy MiniKit (Qiagen) unter Befolgung der entsprechenden Arbeitsvorschrift des Herstellers. Wurde während der RNA-Extraktion keine DNase zugegeben, so wurde anschließend ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μ l 5 μ l der RNA-Probe mit 1 μ l DNaseI (entsprechend 1 Unit), 1 μ l DNaseI-Puffer und 3 μ l RNase-freiem Wasser für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l 25mM EDTA und Erhitzen der Probe für 5 Minuten auf 65°C gestoppt.

Die isolierte RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurden 10 μ l DNase-behandelte RNA mit 1 μ l mRNA-spezifischem Oligo-dT-Primer für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden unter Kühlung (4°C) 4 μ l 5x MuVL-Puffer, 2 μ l 10 mM dNTP, 1 μ l RNase-Inhibitor (entsprechend 40 Units) und 1 μ l RNase-freies Wasser zugegeben und der Ansatz für 5 min auf 37°C erwärmt. Nach Zugabe von 1 μ l MuVL-Reverse-Transkriptase (entsprechend 20 Units) wurde der Ansatz für 1 h bei 42°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt und die Probe mit sterilem RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l verdünnt. Um Qualität und Quantität der cDNA zu überprüfen wurde eine β -Tubulin-Kontrolle mittels PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.6 aufgeführt.

2.2.2 Real-time PCR

Für Expressionsanalysen mittels Real-time PCR wurde zunächst die Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp und den zu untersuchenden Mutanten wie beschrieben isoliert. Zur Quantifizierung der DNA während der Real-time PCR wurde der iQTM SYBR® Green Supermix der Firma Bio-Rad

verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes richtete sich nach der Empfehlung der entsprechenden Arbeitsvorschrift (Informationsblatt iQ™ SYBR® Green Supermix 170-8882), wobei die Volumina der Bestandteile, sowie das Endvolumen halbiert wurden:

iQ SYBR Green Supermix	12,5 µl
Primer 1 (s. Kapitel 2.1.6)	500 nM
Primer 2 (s. Kapitel 2.1.6)	500 nM
DNA-Template	1 µl
Steriles Wasser	auf 25 µl

Die Amplifikation der untersuchten Gene erfolgte nach folgendem Protokoll:

Protokoll Real-time PCR

<i>Zyklus</i>	<i>Schritt</i>	<i>Wiederholungen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Zyklus 1	Schritt 1	1	95°C	2 min
	Schritt 1		95°C	30 sec
Zyklus 2	Schritt 2	45	56°C	30 sec
	Schritt 3		72°C	30 sec
Zyklus 3	Schritt 1	1	95°C	1 min
Zyklus 4	Schritt 1	1	55°C	30 sec
Zyklus 5	Schritt 1	80	55 – 95°C	Steigerung alle 10 sec um 0,5°C

2.2.3 Cytologische Untersuchungen

2.2.3.1 DAPI-Färbung und Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Durchführung erfolgte nach einer Vorschrift von Maluszynska und Heslop-Harrison (1991) und Bleuyard und White (2004) mit einigen Modifikationen. Blütenstände von *Arabidopsis*-Mutanten und Wildtyp-Pflanzen mit ungeöffneten Blüten wurden geerntet und für 30 Minuten in 2 mM 8-Hydroxychinolin-Lösung inkubiert. Die Flüssigkeit wurde entfernt und die Blütenknospen 2-3 mal für 30 Minuten in einer (frisch hergestellten) Mischung aus Methanol : Eisessig (3 : 1) inkubiert bis die Blüten entfärbt waren. Die fixierten Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Fixierte Blütenknospen wurden zwei Mal für 2-3 Minuten in 0,01 M Citratpuffer gewaschen und in 0,01 M Citratpuffer, der 0,2% Cellulase und 2% Pektinase enthielt, verdaut. Der Verdau erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Kammer bei 37°C für 30-35 Minuten. Die Verdaulösung wurde vollständig entfernt und die Blütenknospen vorsichtig zwei Mal 5 Minuten mit 0,01 M Citratpuffer gewaschen.

Antheren von Blütenknospen der Stadien 8 bis 10 (Smyth et al., 1990) (Größe ca. 0,3-0,5 mm) wurden auf einem Objektträger in einem Tropfen 45% Essigsäure isoliert, mit einem Deckglas abgedeckt und die Blütenpollen durch leichten Druck aus den Antheren freigesetzt. Zur Entfernung des Deckglases wurde der Objektträger für 30 Sekunden in Flüssigstickstoff getaucht und das Deckglas mit Hilfe einer Rasierklinge entfernt. Die Präparate wurden luftgetrocknet und nach vollständiger Trocknung mit 12 µl VECTASHIELD mounting medium mit 1,5 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) versehen. Ein Deckglas wurde aufgelegt und versiegelt.

Die Analyse meiotischer und mitotischer Stadien erfolgte durch Epifluoreszenz-Mikroskopie, anfangs unter Verwendung des ZEISS Axioskop 2 FS mit ZEISS AxioCam und später des ZEISS AxioImager.M1 mit ZEISS AxioCam MRm-Kamera. Die Bilder wurden anschließend mit der Software ZEISS AxioVision LE bearbeitet, wobei zunächst die Version 4.3 und später die Version 4.6 verwendet wurde.

2.2.3.2 DIC-Mikroskopie

Die Methode der Präparation von Samenanlagen und Antheren basierte auf einer Beschreibung von Siddiqi et al. (2000) mit einigen Modifikationen. Blütenstände verschiedener *Arabidopsis*-Mutanten und von Wildtyp-Pflanzen wurden geerntet und in FAA-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Blütenknospen in einer Acetonserie von aufsteigend 50-100% in 10%-Schritten dehydriert, wobei die Inkubationszeit für 50 und 60% 15 Minuten und für die restlichen Konzentrationen 30 Minuten (Raumtemperatur) betrug. Anschließend wurden die Blütenknospen für 2 Stunden mit Ethylbenzoat behandelt, wodurch das Pflanzenmaterial transparent wurde. Nach Entfernen des Ethylbenzoats wurde zweimal mit dünnflüssigem Paraffinöl gewaschen und die Blütenknospen anschließend in der selben Flüssigkeit bei 4°C für maximal 4 Wochen gelagert.

Aus Blütenknospen der Entwicklungsstadien 9 bis 12 (Smyth et al., 1990; Robinson-Beers et al., 1992) wurden die Fruchtknoten heraus präpariert, geöffnet und die Samenanlagen isoliert. Zur Untersuchung von Antheren wurden Blütenknospen der Stadien 8 bis 9 und 11 bis 12 (Smyth et al., 1990) verwendet und die Staubblätter vorsichtig vereinzelt, um Verletzungen der Antheren zu vermeiden. Die Präparation erfolgte auf einem Objektträger in 1 Tropfen dünnflüssigem Paraffin. Anschließend wurde ein Deckglas aufgelegt und versiegelt. Die Präparate konnten für mehrere Wochen ohne Qualitätsverlust aufbewahrt werden.

Siddiqi et al. (2000) verwendeten als Einbettungsmittel eine Mischung aus Methylbenzoat und einem Epoxidharz nach Spurr (1969) im Verhältnis 7:1. Es zeigte sich jedoch, dass die Präparate nur maximal bis zum nächsten Tag haltbar waren. Daher wurde nach verschiedenen Tests dünnflüssiges Paraffin als das geeignetere Einbettungsmittel ermittelt. Auf diese Weise können die Präparate für mehrere Wochen ohne Qualitätsverlust aufbewahrt werden. Der Austausch des Einbettungsmittels erfolgte ebenfalls ohne Veränderung der Präparatequalität.

Antheren und Blütenpollen wurden mittels DIC (Differential Interference Contrast)-Mikroskopie untersucht. Dies erfolgte zunächst unter Verwendung des ZEISS Axioskop 2 FS mit ZEISS AxioCam und später des ZEISS AxioImager.M1 mit ZEISS AxioCam MRm-Kamera. Zur Bearbeitung der Bilder wurde die Software ZEISS AxioVision LE (anfängs Version 4.3, später Version 4.6) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 CHARAKTERISIERUNG VON *brca2*-MUTANTEN

3.1.1 Charakterisierung der *BRCA2(IV)*- und *BRCA2(V)*-T-DNA-Insertionsmutanten

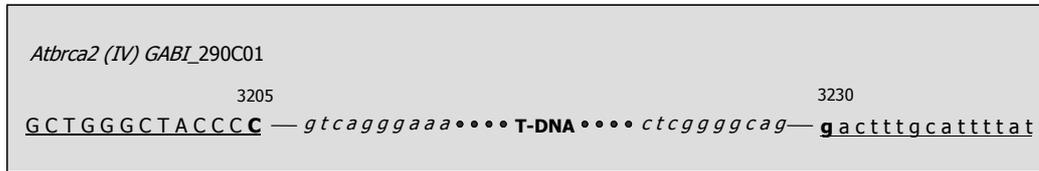
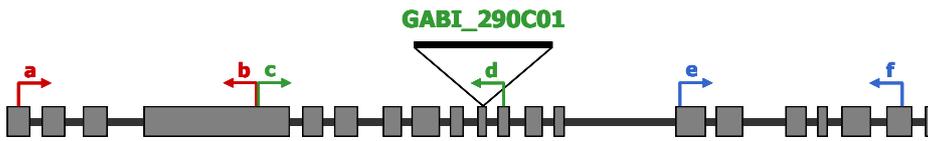
Die T-DNA-Insertionslinien GABI_290C01 (*BRCA2(IV)*) und SALK_037617 (*BRCA2(V)*) wurden zu Herstellung einer *brca2(IV)/brca2(V)*-Doppelmutante verwendet. Von jeder Einzelmutante wurde zunächst die Lokalisation der T-DNA-Insertion durch PCR und Sequenzierung des PCR-Produktes ermittelt. Die T-DNA-Insertion in *BRCA2(IV)* (GABI_290C01) befindet sich innerhalb des zehnten Exons, etwa in der Mitte des Gens, in der Nähe der NLS (Abb. 11 A, C). Die Insertion zwischen den Nukleotiden 3205 und 3230 hat zu einer Deletion von 24 Basenpaaren (bp) geführt. *BRCA2(V)* enthält die T-DNA-Insertion innerhalb des vierten Exons im Bereich der BRC-Repeats (Abb. 11 B, C). Die T-DNA, deren Insertion eine Deletion von acht Basenpaaren verursacht hat, befindet sich zwischen den Nukleotiden 1742 und 1751. In beiden Fällen wird die T-DNA durch „left border“-Sequenzen (LB) flankiert, was auf eine doppelte T-DNA-Insertion in entgegengesetzter Orientierung hinweist.

3.1.2 Charakterisierung der *brca2(IV)/brca2(V)*-Doppelmutante

Aus den Einzelmutanten wurde durch Kreuzung eine *brca2(IV)/brca2(V)*-Doppelmutante hergestellt. Zur Verkürzung der Schreibweise soll diese Mutante im Folgenden im Text als *brca2(IV)/(V)* und in Abbildungen als *brca2* bezeichnet werden.

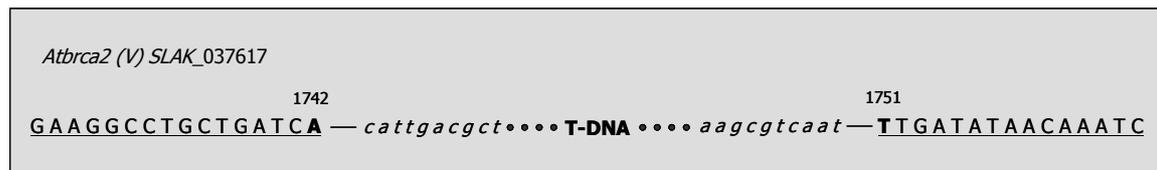
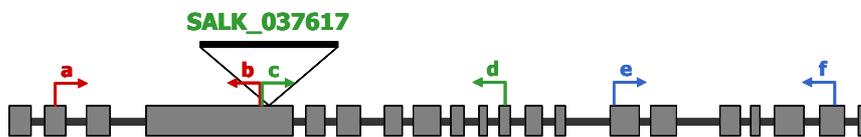
Um zu zeigen, dass im homozygoten *brca2(IV)/(V)*-Hintergrund kein Transkript entsteht, aus dem ein funktionsfähiges *BRCA2*-Gesamtprotein entsteht, wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt, die das Expressionsniveau von *BRCA2*-Fragmenten vor und nach den T-DNA-Insertionen und über die Insertionen hinweg zeigt (Abb. 11 A, B, D). Dazu wurde die Gesamt-RNA von Wildtyp-Pflanzen und homozygoten *brca2(IV)/(V)*-Pflanzen extrahiert und die mRNA über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Primerpaare wurden so konzipiert,

***A*BRCA2 (IV) At4g00020/00010**

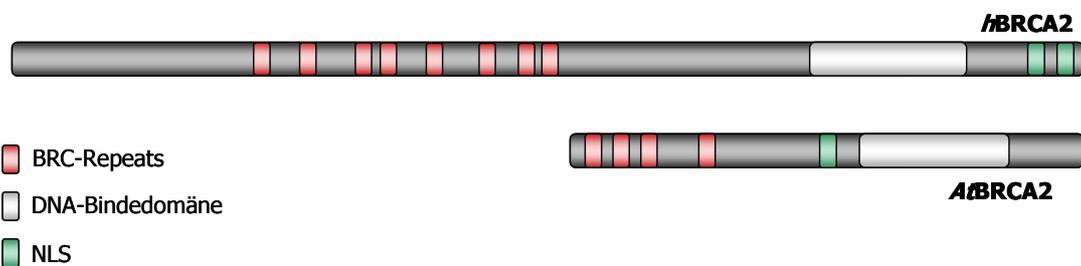


A

***A*BRCA2 (V) At5g01630**

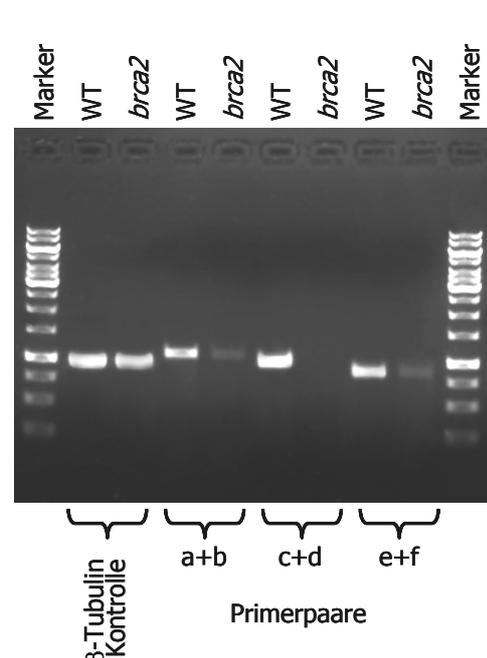


B



C

Abb. 11: Charakterisierung der *brca2(IV)*-, *brca2(V)* und *brca2(IV)/(V)*-Mutanten. **A, Lokalisation der T-DNA-Insertion in *brca2(IV)*; **B**, Lokalisation der T-DNA-Insertion in *brca2(V)*; **C**, Proteinmodell von *A*BRCA2 im Vergleich zum menschlichen Homologen; **D**, Expressionsanalyse zur Bestimmung der BRCA2-Transkription bei *brca2(IV)/(V)* im Vergleich zum Wildtyp. Das Primerpaar a+b amplifiziert ein BRCA2-Fragment im N-Terminus, c+d über die T-DNA-Insertion hinweg und e+f im C-terminalen Bereich; die β -Tubulin-Kontrolle zeigt, dass der cDNA-Gehalt bei der Wildtyp-Probe und der *brca2(IV)/(V)*-Probe gleich hoch ist.**



D

dass sie sowohl im N-terminalen Bereich, in der Mitte und am C-Terminus der beiden *BRC A2*-cDNAs binden können. Wie in Abbildung 11 D zu sehen ist, können vor und nach der T-DNA-Insertion *BRC A2*-Fragmente exprimiert werden. Im Bereich der Insertionen findet jedoch keine *BRC A2*-Amplifikation statt, was bedeutet, dass die Doppelmutante nicht zur Transkription eines *BRC A2*-Gesamtfragmentes fähig ist.

Während des somatischen Wachstums zeigte sich die Doppelmutante vital und entwickelte eine adulte Pflanze mit der Fähigkeit zur Blütenbildung. Nach der Selbstung doppelt-homozygoter *brca2(IV)/(V)*-Pflanzen entstanden im Vergleich zum Wildtyp jedoch sehr kleine Schoten, die keine Samen enthielten (Abb. 12 B). Im Gegensatz zur RNAi-Mutante von Siaud et al. (2004) ist die *brca2(IV)/(V)*-Mutante demnach völlig steril (bezogen auf eine Selbstbefruchtung). Im Vergleich zum Wildtyp entwickelte die Doppelmutante deutlich mehr Sprosse; möglicherweise versucht sie auf diese Weise die Sterilität zu kompensieren (Abb. 12 A). Die Einzelmutanten zeigen, im Gegensatz zur Doppelmutante, weder während des somatischen Wachstums noch während der Reproduktionsphase phänotypische Unterschiede zum Wildtyp *Arabidopsis*-Col-0 (WT in Abbildungen), was dafür spricht, dass die Funktion der beiden *BRC A2*-Proteine redundant ist.

Um heraus zu finden, ob die Sterilität von *brca2(IV)/(V)* männlicher und/oder weiblicher Natur ist, wurde eine Rückkreuzung mit dem Wildtyp durchgeführt, bei der die Doppelmutante einmal als Mutter- und einmal als Vaterpflanze verwendet wurde. Interessanterweise ergab die Bestäubung von Wildtyp-Fruchtknoten mit *brca2(IV)/(V)*-Blütenpollen keine Samen, während in umgekehrter Richtung einige Nachkommen produziert wurden (Abb. 12 C). Die Quantifizierung der Ausbeute ist allerdings schwierig, da sich weder bei Col-0 x Col-0-Kreuzungen noch bei Rückkreuzungen aus jedem Fruchtknoten eine Schote mit Samen entwickelte. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass einige Fruchtknoten während der Kreuzung leicht beschädigt wurden oder sie entweder noch nicht oder nicht mehr befruchtungsfähig waren. Nach Rückkreuzungen entwickelten sich weitaus häufiger Schoten ohne Samen als nach Col-0 x Col-0-Kreuzungen. Die Menge an Samen pro Schote betrug bei Kreuzungen zwischen Wildtyp-Pflanzen im Durchschnitt 9,5 und nach Verwendung von *brca2(IV)/(V)* als Mutterpflanze 1,5. In beiden Fällen ist die Ausbeute im Vergleich zur natürlichen Samenmenge pro Schote (ca. 45) eher gering, dennoch lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Col-0 x Col-0-Kreuzung und der *brca2(IV)/(V)* (Mutter) x Col-0 (Vater)-Kreuzung erkennen.

Die Nachkommen der Rückkreuzung brachten vitale Pflanzen hervor, die eine dem Wildtyp entsprechende Menge an Samen entwickelten. Um dies zu testen wurden die Samen der Pflanzen aus Rückkreuzungs-Experimenten bezüglich Größe und Form mit Col-0-Samen verglichen (Abb. 12 D) und in beiden Fällen der Gesamtertrag einer Pflanze gewogen. Im Durchschnitt ergab sich dabei für Wildtyp-Pflanzen eine Gesamtmenge von 117,4 mg und für Rückkreuzungspflanzen von 127,6 mg.

Auch wenn die reziproke Rückkreuzung gezeigt hat, dass Fruchtknoten der *brca2(IV)/(V)*-Pflanzen eine geringe Fertilität aufweisen, kann dennoch die Aussage getroffen werden, dass das Ausschalten beider BRCA2-Gene zu Störungen innerhalb der männlichen und der weiblichen Gametophytenentwicklung führt.

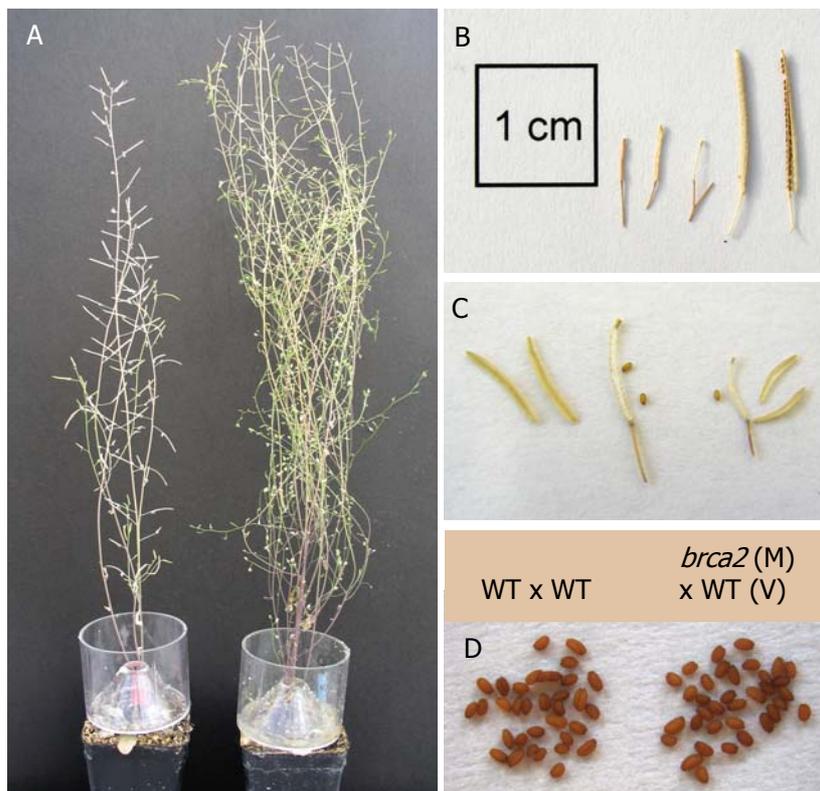


Abb. 12: Gegenüberstellung von Wildtyp und *brca2(IV)/(V)*. **A**, Habitus von *brca2(IV)/brca2(V)* (rechts) im Vergleich zum Wildtyp (links) zum Stadium der Samenreife; **B**, Schoten von *brca2(IV)/(V)* (links) im Vergleich zum Wildtyp (rechts); **C**, Schoten aus der Rückkreuzung einer *brca2(IV)/(V)*-Mutterpflanze mit einer Wildtyp-Vaterpflanze; **D**, Samen der Nachkommen aus *brca2(IV)/(V)* (Mutter) x Col-0 (Vater) im Vergleich zu Nachkommen aus Wildtyp-Kreuzungen

3.2 SOMATISCHE EFFEKTE DER BRCA2-MUTATION

3.2.1 Sind *brca2*-Mutanten sensitiv gegenüber Mutagenen?

Nachdem sich die *brca2(IV)/(V)*-Doppelmutante als steril erwiesen hat, lässt sich bereits vermuten, dass BRCA2 eine wichtige Rolle während der Entwicklung der Gameten spielt. Vor der näheren Untersuchung dieser Funktion soll zunächst gezeigt werden, ob den Proteinen auch auf somatischer Ebene eine Aufgabe zukommt.

Mutanten mit einem Defekt in einem DNA-Reparaturgen zeigen oft eine erhöhte Sensitivität gegenüber mutagenen Agenzien wie z.B. Mitomycin C, Cisplatin oder Bleomycin (z.B. Bleuyard et al., 2004; Abe et al., 2005; Osakabe et al., 2005). Um zu testen, ob BRCA2-Mutanten sensitiv auf Mutagene reagieren, wurden Keimlinge von *A. thaliana*-Col-0, der *brca2(IV)*- und *brca2(V)*-Einzelmутanten und der *brca2(IV)/(V)*-Doppelmutante mit unterschiedlichen Konzentrationen an Mitomycin C (MMC) und Bleomycin (Bleo) behandelt. Dazu wurden oberflächensterilisierte Samen auf GM-Medium und GM-Medium mit 1 µg/ml Bleo, 2 µg/ml Bleo, 5 µg/ml MMC bzw. 10 µg/ml MMC ausgebracht (Abb. 13). Aufgrund der Sterilität der *brca2(IV)/(V)*-Mutante wurde in diesem Fall mit einer segregierenden Linie gearbeitet, die sich in $\frac{1}{4}$ *brca2(IV)^{+/+}/brca2(V)^{-/-}*, $\frac{1}{2}$ *brca2(IV)^{+/-}/brca2(V)^{-/-}* und $\frac{1}{4}$ *brca2(IV)^{-/-}/brca2(V)^{-/-}* aufspaltet. Auf GM-Medium ohne mutagene Zusätze zeigten *brca2(IV)*, *brca2(V)* und *brca2(IV)/(V)* nach drei Wochen Wachstum keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp. Sie entwickelten nach dieser Zeit eine Blattrosette mit acht bis neun Blättern (Abb. 13 und 14). Sowohl mit 1 µg als auch mit 2 µg Bleo zeigten die Mutanten keine signifikant erhöhte Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp. Auf GM-Medium mit 1 µg Bleo wurden nach drei Wochen bei allen Linien fünf bis sechs Blätter pro Pflanzen gezählt und ein durchschnittliches Frischgewicht von ~40% gegenüber unbehandelten Proben ermittelt (Abb 13, 14, 15). Durch Angabe der prozentualen Veränderung des Frischgewichtes anstelle des tatsächlichen Gewichtes in Gramm können leichte Gewichtsunterschiede, die sich zwischen den Ansätzen unbehandelter Pflanzen ergeben, ausgeglichen und somit eine einheitliche Bezugsgröße geschaffen werden. Die Veränderung des Gewichtes kann somit in allen Fällen auf den gleichen Grundwert bezogen werden, was eine eindeutigere Angabe der Werte ermöglicht. Mit 2 µg/ml Bleo reduzierte sich die Anzahl an Rosettenblätter bei allen Linien auf drei bis vier und das Frischgewicht auf ~20% (Abb 13, 14, 15). Die *brca2(IV)*- und *brca2(V)*-Einzelmутanten und die *brca2(IV)/(V)*-Doppelmutante zeigen demnach keine erhöhte Bleomycin-Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp.

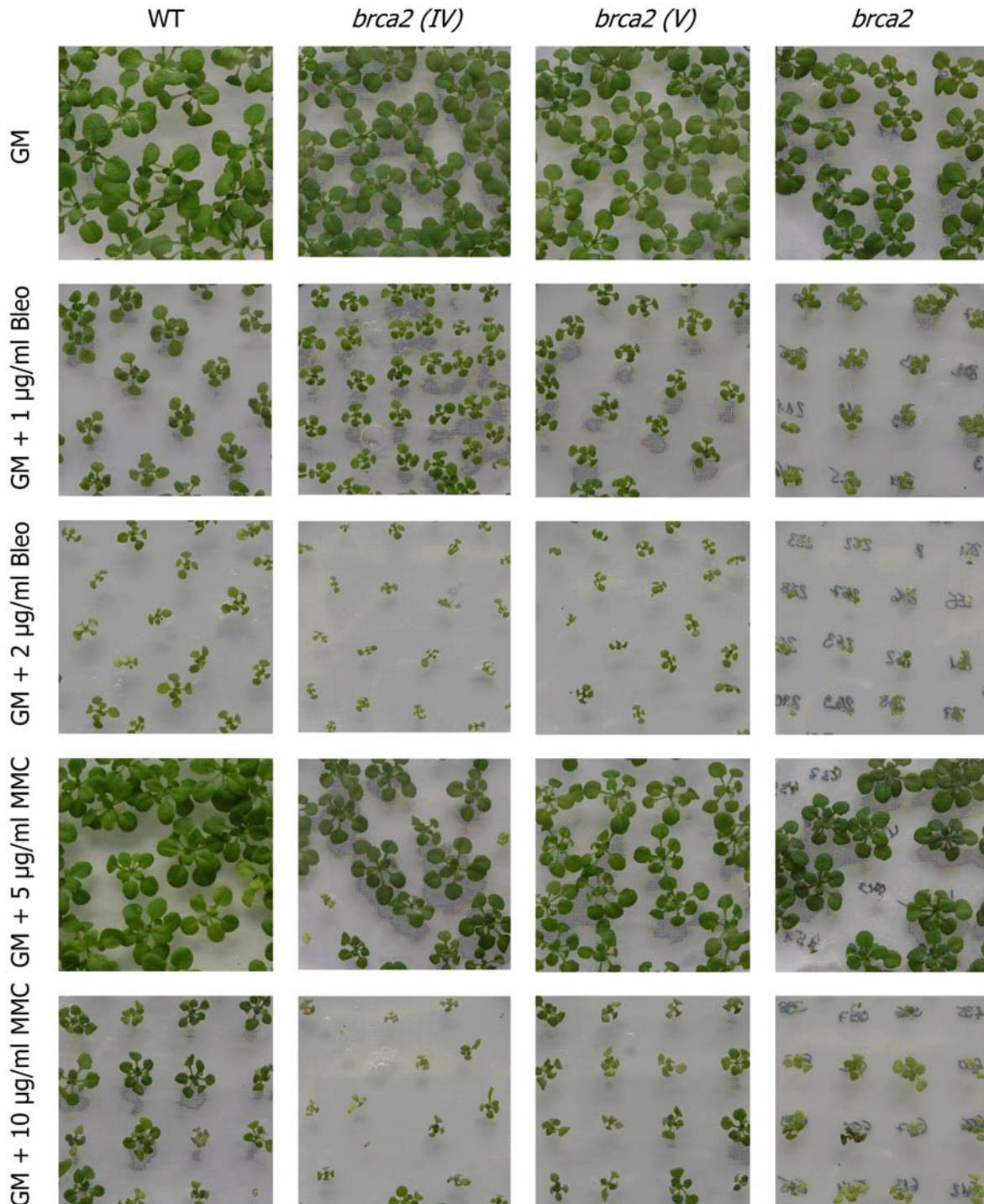


Abb. 13: Sensitivitätstest. *A. thaliana*-Col-0, *brca2(IV)*, *brca2(V)* und *brca2(IV)/(V)* wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Bleomycin (Bleo) und Mitomycin C (MMC) behandelt. Bei *brca2(IV)/(V)* handelt es sich um eine segregierende Linie, die sich in $\frac{1}{4}$ *brca2(IV)^{+/+}/brca2(V)^{-/-}*, $\frac{1}{2}$ *brca2(IV)^{+/+}/brca2(V)^{-/+}* und $\frac{1}{4}$ *brca2(IV)^{-/-}/brca2(V)^{-/+}* aufspaltet. Keine der Mutanten zeigt eine signifikant erhöhte Sensitivität gegen Bleo. Nach Behandlung mit 5 µg/ml und 10 µg/ml MMC ist ca. $\frac{1}{4}$ des segregierenden *brca2(IV)/(V)*-Ansatzes sensitiv gegen Mitomycin C. Die Überprüfung des Genotyps dieser sensitiven Keimlinge hat ergeben, dass es sich dabei um doppelt-homozygote Pflanzen handelt. Auch innerhalb der homozygoten *brca2(IV)*-Linie zeigen einige Keimlinge eine erhöhte Sensitivität gegen MMC. Dieser Effekt ist auf Gen-Silencing zurückzuführen.

Während Bleomycin direkt Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA verursacht, beruht die mutagene Wirkung von Mitomycin C auf der Einführung von Interstrang-Crosslinks, die während der DNA-Replikation zu Strangbrüchen führen. Somit kann die Reaktion der Mutanten auf DNA-Brüche während unterschiedlichen Zellzuständen untersucht werden. Um zu prüfen ob BRCA2-Mutanten eine Sensitivität gegenüber MMC zeigen, wurden Wildtyp-Pflanzen, Einzelmutanten und die Doppelmutante auf GM-Medium mit 5 µg/ml MMC ausgebracht. Die

Anzahl der Blätter bei *brca2*-Einzel- und Doppelmutanten nach Mutagenbehandlung

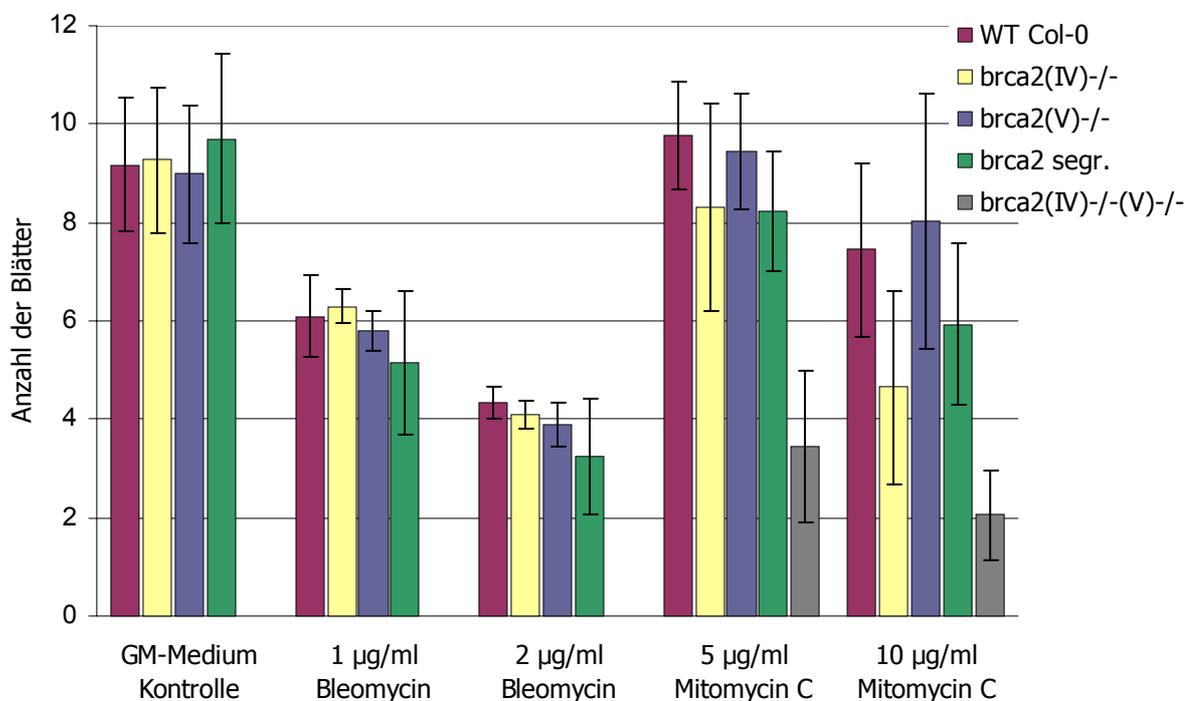


Abb. 14: Anzahl der Blätter nach Mutagenbehandlung von *A. thaliana*-Wildtyp, *brca2(IV)*, *brca2(V)* und *brca2(IV)/(V)*. *A. thaliana*-Col-0, *brca2(IV)*, *brca2(V)* und *brca2(IV)/(V)* wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Bleomycin (Bleo) und Mitomycin C (MMC) behandelt. Die Linie *brca2 segr.* spaltet in $\frac{1}{4}$ *brca2(IV)^{+/+}brca2(V)^{-/-}*, $\frac{1}{2}$ *brca2(IV)^{+/-}brca2(V)^{-/-}* und $\frac{1}{4}$ *brca2(IV)^{-/-}brca2(V)^{-/-}* auf. Nach Behandlung mit Bleo zeigt keine Mutante eine deutliche Veränderung der Blattzahl gegenüber dem Wildtyp. Die Behandlung mit 5 µg/ml MMC führt bei *brca2(IV)^{-/-}(V)^{-/-}* zu einer deutlichen Verminderung der Blattzahl von 9-10 auf ca. durchschnittlich 3-4 und mit 10 µg/ml auf durchschnittlich 2. Diese deutliche Verringerung der Blattzahl führt auch im Gesamtansatz *brca2 segr.* zu einer Verringerung der Anzahl an Rosettenblätter im Vergleich zum Wildtyp. Auch bei *brca2(IV)* ist diese Abnahme nach Behandlung mit 5 µg/ml und 10 µg/ml MMC zu erkennen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass einige Keimlinge dieses Ansatzes aufgrund eines Gen-Silencing-Effektes eine erhöhte MMC-Sensitivität aufweisen.

**Frischgewicht von *brca2*-Einzel- und Doppelmutanten
nach Mutagenbehandlung**

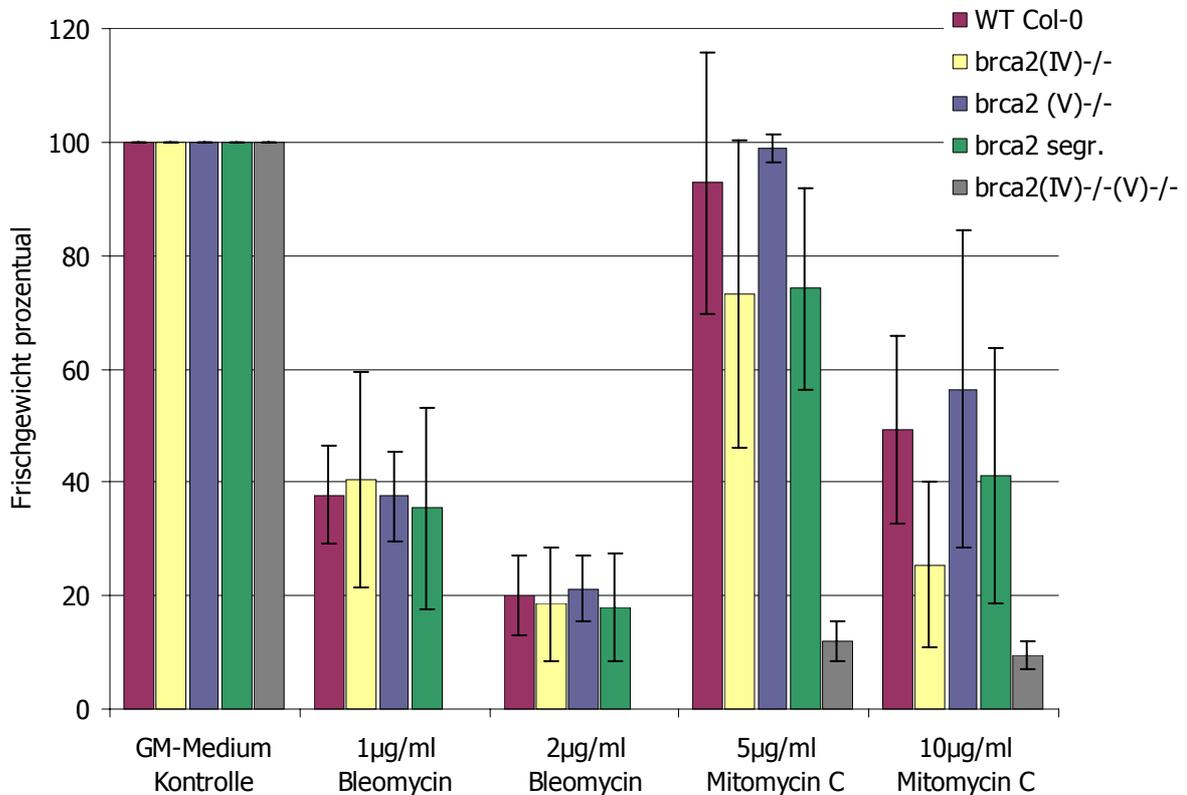


Abb. 15: Frischgewicht nach Mutagenbehandlung von *A. thaliana*-Col-0, *brca2(IV)*, *brca2(V)* und *brca2(IV)/(V)*. *A. thaliana*-Col-0, *brca2*-Einzel- und Doppelmutanten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Bleomycin (Bleo) und Mitomycin C (MMC) behandelt. Die Linie *brca2 segr.* spaltet in $\frac{1}{4}$ *brca2(IV)*^{+/+}*brca2(V)*^{-/-}, $\frac{1}{2}$ *brca2(IV)*^{+/-}*brca2(V)*^{-/-} und $\frac{1}{4}$ *brca2(IV)*^{-/-}*brca2(V)*^{-/-} auf. Nach Behandlung mit Bleo verringert sich das Frischgewicht (FG) der Mutanten in gleichem Maße wie beim Wildtyp. Die Behandlung mit 5 µg/ml MMC führt bei *brca2(IV)*^{-/-}(*V*)^{-/-} zu einer Verminderung des FG auf ca. 11%, während das FG des Wildtyps nur auf durchschnittlich 90% sinkt. Mit 10 µg/ml Bleo verringert sich das FG des *brca2(IV)*^{-/-}(*V*)^{-/-}-Ansatzes auf ca. 9% im Vergleich zum Wildtyp mit durchschnittlich 50%. Das deutlich verminderte FG führt auch im Gesamtansatz *brca2 segr.* zu einer Gewichtsabnahme im Vergleich zum Wildtyp. Die Verringerung des FG im *brca2(IV)*-Ansatz nach Behandlung mit 5 µg/ml und 10 µg/ml MMC ist auf Gen-Silencing zurückzuführen, das einige, jedoch nicht alle Keimlinge dieses Ansatzes betrifft.

brca2(V)-Mutante zeigte bezüglich ihres Wachstums keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 13), was durch die Anzahl der Rosettenblätter und der Bestimmung des Frischgewichtes bestätigt wird (Abb. 14, 15). In beiden Fällen wurden mit 5 µg/ml MMC durchschnittlich neun bis zehn Blätter gezählt und ein Gewicht zwischen 90 und 100% ermittelt. Auffällig ist die hohe Varianz der Blattzahl in Ansätzen mit *brca2(IV)*. In Abbildung 13 ist zu

sehen, dass einige Keimlinge dieser Mutante deutlich kleiner sind, was in der Reduktion der durchschnittlichen Blattzahl auf acht und des Frischgewichtes auf ~75% resultiert. Eine ähnliche Situation zeigt sich in Ansätzen der *brca2(IV)/(V)*-Mutante. Auch hier sind einige Pflanzen eindeutig kleiner, wodurch sich eine Verminderung der durchschnittlichen Blattzahl auf acht und des Frischgewichtes auf ~75% ergibt. Im Gegensatz zur *brca2(IV)/(V)*-Mutante, bei der in allen Ansätzen ca. ¼ der gesamten Aussaat vom verminderten Wachstum betroffen sind, ergibt sich für die *brca2(IV)*-Mutante eine sehr variable Anzahl sensitiver Keimlinge. Durch Erhöhung der MMC-Menge von 5 auf 10 µg/ml können die bereits beschriebenen Effekte zwar bestätigt und auch intensiviert werden, da die Werte aufgrund der hohen MMC-Konzentration zwischen den Ansätzen jedoch sehr variabel sind, soll auf eine nähere Betrachtung dieses Ansatzes verzichtet werden.

Durch Extraktion der genomischen DNA und der Bestimmung des Genotyps mittels PCR konnte für MMC-behandelte *brca2(IV)/(V)*-Ansätze gezeigt werden, dass es sich bei den ca. 25% kleineren Keimlingen tatsächlich um doppelt-homozygote *brca2(IV)/(V)*-Mutanten handelt. Für diese Keimlinge wurde die Anzahl der Blätter und das Frischgewicht nach Behandlung mit 5 µg/ml und 10 µg/ml MMC zusätzlich gesondert ermittelt (Abb 14 und 15). Auch hier sollen aufgrund der hohen Abweichungen zwischen den Ansätzen mit 10 µg/ml MMC nur die Werte nach Behandlung mit 5 µg/ml MMC betrachtet werden. Die Anzahl der Blätter verringert sich im Vergleich zum gesamten Ansatz von acht auf drei bis vier, das Frischgewicht von 75% bei Auswertung des Gesamtansatzes auf 11%. Es kann demnach die Aussage getroffen werden, dass eine doppelt-homozygote *brca2(IV)/(V)*-Doppelmutante eine deutliche Sensitivität gegen Mitomycin C im Vergleich zum Wildtyp zeigt.

3.2.2 Gen-Silencing

Da die Aufspaltung innerhalb der MMC-behandelten *brca2(IV)*-Proben keinen Segregationsregeln folgt, wurde angenommen, dass dieser Effekt durch Gen-Silencing hervorgerufen wird. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde von Wildtyp-Pflanzen, von normal wachsenden *brca2(IV)*-Keimlingen und von Pflanzen mit sichtbarer MMC-Sensitivität die Gesamt-RNA extrahiert und eine reverse Transkription durchgeführt. Die cDNA wurde zur Bestimmung der *BRC42*-Transkriptmenge mittels Real-time-PCR verwendet. Die Primer wurden so konzipiert, dass sich die zu amplifizierende Region in der Mitte des Gens, in der Nähe der T-DNA-Insertionen

befindet. Innerhalb dieses Bereichs sollten beim Wildtyp beide *BRC A2*-Gene amplifiziert werden und bei *brca2(IV)* nur die Transkripte, die durch *BRC A2(V)* codiert werden. Interessanterweise entspricht das Expressionsniveau einer unbehandelten *brca2(IV)*-Mutanten im Wesentlichen dem des Wildtyps (Abb. 16). Das Gleiche trifft für MMC-behandelte, normal wachsende *brca2(IV)*-Keimlinge zu. Dies bedeutet, dass bei Ausfall des einen Gens das andere dessen Funktion vollständig zu übernehmen scheint, was eine Steigerung der Transkriptionsrate von *BRC A2(V)* auf das Doppelte bedeuten würde. Betrachtet man die Werte der MMC-behandelten sensitiven

BRCA2-Transkriptionsniveau von *brca2(IV)* nach Behandlung mit MMC

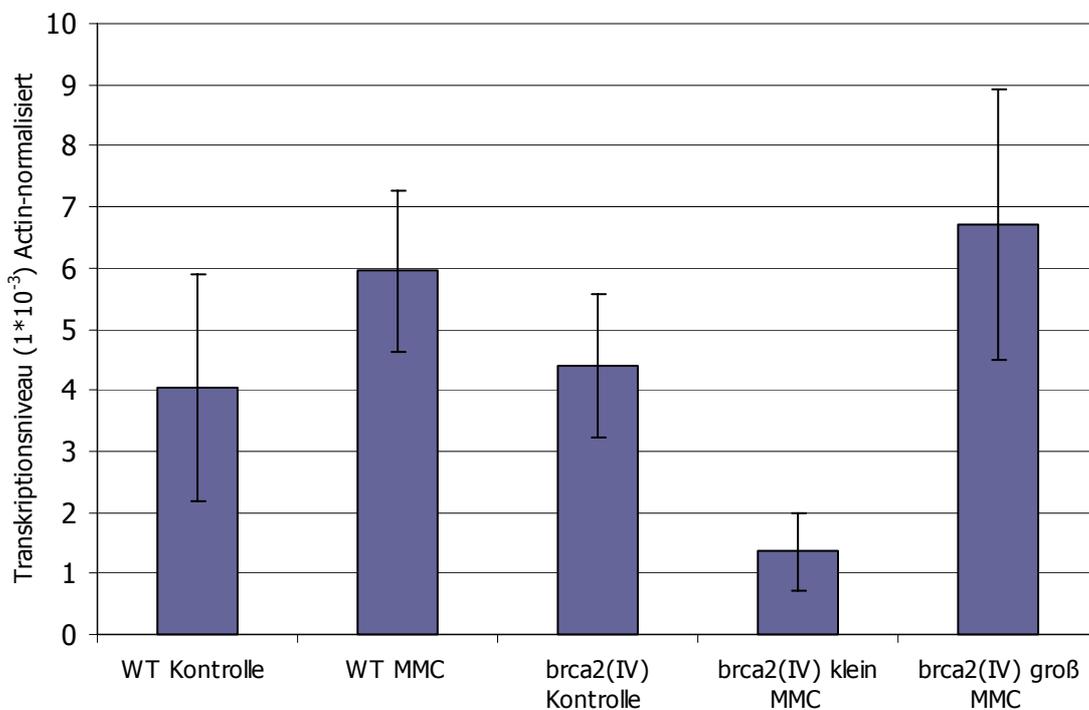


Abb. 16: Ermittlung des Transkriptionsniveaus von *BRC A2* in MMC-behandelten *brca2(IV)*-Keimlingen mittels Real-time PCR. Nach Behandlung von *brca2(IV)*-Keimlingen mit Mitomycin C (MMC) waren einige Keimlinge im Vergleich zum Gesamtansatz deutlich in ihrem Wachstum gehemmt. Es wurde das *BRC A2*-Transkriptionsniveau in MMC-behandelten *A. thaliana*-Col-0- und *brca2(IV)*-Keimlingen und den entsprechenden Kontrollen ermittelt. Das Expressionsniveau unbehandelter *brca2(IV)*-Mutanten entspricht im Wesentlichen dem des Wildtyps. Normal wachsende MMC-behandelte *brca2(IV)*-Keimlinge zeigen ebenfalls eine dem Wildtyp entsprechende Transkriptmenge. Bei MMC-behandelten, kleinen Keimlingen ist das *BRC A2*-Transkriptniveau im Vergleich zu Wildtyp-Proben und normal wachsenden *brca2(IV)*-Pflanzen deutlich kleiner. Dieser Effekt wird durch Gen-Silencing, das in einigen Keimlingen der *brca2(IV)*-Proben auftritt, ausgelöst.

Keimlinge, so ist festzustellen, dass das Transkriptionsniveau im Vergleich zu Wildtyp-Proben und nicht-sensitiven *brca2(IV)*-Pflanzen deutlich kleiner ist. Da der Effekt der Aufspaltung nur nach MMC-Behandlung auftritt, gilt die *brca2(IV)*-Kontrolle gleichermaßen für kleine und normal wachsende MMC-behandelte *brca2(IV)*-Keimlinge. Das Experiment bestätigt eindeutig die Vermutung des Gen-Silencing innerhalb der MMC-behandelten *brca2(IV)*-Linie.

3.3 ENTWICKLUNGSSTÖRUNGEN DER REPRODUKTIONSORGANE

Von einigen der hier untersuchten Mutanten liegen bereits Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen vor. Daher soll vor der Vorstellung eigener Ergebnisse eine kurze Zusammenfassung der bereits durchgeführten Studien gegeben und Unterschiede zu den hier vorliegenden Arbeiten aufgezeigt werden.

Cytologische Untersuchungen wurden bereits an drei *spo11-1*-Mutanten durchgeführt, bei denen es sich in zwei Fällen um allelische Punktmutationslinien handelte. Die dritte Mutante war eine T-DNA-Insertionslinie mit Wassilewskija (Ws)-Hintergrund (Grelon et al., 2001). Der meiotische Phänotyp von *spo11-2* wurde bisher unter Verwendung zweier Transposon-Mutanten gezeigt (Stacey et al., 2006). Um vergleichbare Daten zu erhalten wurden für die hier durchgeführten Untersuchungen *spo11-1*- und *spo11-2*-T-DNA-Insertionslinien mit Columbia-Hintergrund (Col-0) verwendet und als *spo11-1-3* (SALK_146172) bzw. *spo11-2-3* (GABI_749C12) bezeichnet (Hartung et al., 2007a). Die beiden T-DNA-Insertionslinien wurden zur Herstellung einer doppelt-homozygoten *spo11-1/spo11-2*-Linie verwendet, da bisher keine Daten zur Charakterisierung einer entsprechenden Doppelmutante vorlagen.

Auch für eine *brca2*-Mutante sind bereits cytologische Daten vorhanden, die unter Anwendung einer *BRC A2*-RNAi-Linie gewonnen wurden (Siaud et al., 2004). Da RNAi-vermitteltes Gen-Silencing oft zu einer Reduktion der Proteinfunktion und nicht zu deren Ausschaltung führt, sollte hier eine *brca2(IV)/(V)*-Doppelmutante, die durch Kreuzung zweier T-DNA-Insertionslinien hergestellt wurde, für mikroskopische Untersuchungen dienen. Da die *brca2(IV)/(V)*-Doppelmutation nicht in einer verminderten Fertilität sondern in einer völligen Sterilität der Pflanze resultierte (bezogen auf die Selbstung einer Population), kann angenommen

werden, dass es sich bei *brca2(IV)/(V)* um eine BRCA2-Nullmutante handelt. Es sollte gezeigt werden, ob der Sterilität dieser Mutanten die gleichen meiotischen Defekte zugrunde liegen wie für die RNAi-Linie gezeigt wurde (Siaud et al., 2004). Weiterhin sollten Entwicklungsstörungen weiblicher Gametophyten näher betrachtet werden.

Die *rad51*-T-DNA-Insertionslinie (GABI-KAT_134A01) wurde bereits durch Li et al. (2004) ausführlich cytologisch charakterisiert. Da diese *rad51*-Mutante hier jedoch als wichtige Kontroll-Linie verwendet wird, sollen die wesentlichen cytologischen Eigenschaften noch einmal vorgestellt werden.

Es wurde gezeigt, dass TOP3 α in somatischen Zellen eine wichtige Rolle spielt, die vermutlich auf der Beteiligung bei der Auflösung von Rekombinationsintermediaten, im speziellen von dHJ-Strukturen, beruht (Wu und Hickson, 2003; Plank et al., 2006). In Hefezellen wurde weiterhin gezeigt, dass das Ausschalten von TOP3 zur gestörten Sporenbildung führt und es wurde postuliert, dass dieser Defekt durch Unterbrechung der meiotischen Rekombination verursacht wird (Gangloff et al., 1999). Da auch während der Meiose dHJ-Strukturen gebildet werden, soll eine *A. thaliana-top3 α* -Mutante auf das Vorkommen meiotischer Defekte untersucht werden. Zwei *top3 α* -T-DNA-Insertionslinien wurden charakterisiert, von denen sich *top3 α -1* (SALK_139357) als letal erwiesen hat (Hartung et al., 2007b), während die zweite Mutante, *top3 α -2* (GABI_476A12) steril, jedoch lebensfähig ist (Frank Hartung, persönliche Kommunikation). Die Letalität der *top3 α -1*-Insertion beruht möglicherweise auf der Position der T-DNA-Insertion im C-terminalen Bereich des TOP3 α -Gens. Dies ermöglicht eventuell die Expression eines TOP3 α -Fragmentes, das mit weiteren Faktoren interagieren kann, die jedoch in Assoziation mit einem unvollständigen TOP3 α -Fragment ihre Funktion nicht mehr erfüllen können (Frank Hartung, persönliche Kommunikation).

3.3.1 Phänotyp der Blüten

Den ersten Hinweis, dass eine zu untersuchende Mutante einen sterilen Phänotyp aufweist, erhält man oft bereits während der Blütenbildung. Um dies zu untersuchen wurden Blüten von *spo11-1*- und *spo11-2*-Einzelmutanten, der *spo11-1/spo11-2*-Doppelmutante, der *brca2(IV)/(V)*-Doppelmutante und der *top3 α* -Mutante während Stadium 14 der Blütenentwicklung (Smyth et al., 1990) entfernt und mittels Olympus-SZX12-Binokular mit ColorView Soft Imaging System betrachtet und fotografiert. Alle der hier untersuchten Mutanten brachten im Vergleich zum Wildtyp

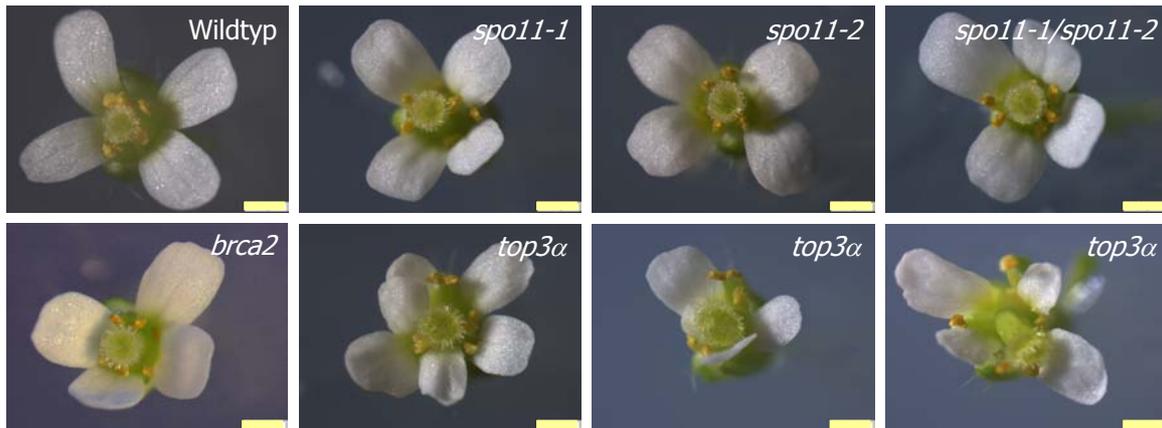


Abb. 17: Phänotyp der Blüten. Im Vergleich zum Wildtyp enthalten Mutanten von *spo11-1*, *spo11-2*, *spo11-1/spo11-2*, *brca2* und *top3α* verkürzte Staubblätter, deren Antheren vorzeitig degenerieren. Blüten der *top3α*-Mutante besitzen zusätzlich morphologische Veränderungen, die sich in einer abweichenden Anzahl an Blüten- und Staubblättern und Missbildungen des Fruchtknotens zeigen. Balken: 500 μ m

verkürzte Staubblätter hervor, die außerdem eine deutlich frühere Degeneration der Antheren zeigten (Abb. 17). Neben diesen Effekten konnten bei *top3α* auch somatische Entwicklungsstörungen beobachtet werden, die sich im Falle der Blütenbildung durch eine variierende Anzahl an Blüten- und Staubblättern und Missbildungen des Fruchtknotens äußerten. Fehlbildungen treten bei dieser Mutante bereits während des gesamten vegetativen Wachstums auf (Frank Hartung, persönliche Kommunikation).

Diese Beobachtungen zeigen, dass die Blütenmorphologie bereits vor der Fruchtbildung auf eine eventuelle Sterilität der Pflanze hinweist. Einzelne Blütenorgane, wie Antheren und Samenanlagen sollen nun durch cytologische Methoden näher untersucht werden.

3.3.2 Die Entwicklung der Antheren

Zur Untersuchung der Antheren wurden von Mutanten und *Arabidopsis*-Col-0 Blütenknospen fixiert, entfärbt und zur Isolierung der Stamina verwendet. Es wurden Staubblätter der Stadien 8 bis 9 und 11 bis 12 entfernt (Smyth et al., 1990) und mittels DIC-Mikroskopie (Differential Interference Contrast) untersucht. Die jüngeren Stadien wurden zur Beobachtung der Tetradenbildung und die weiter fortgeschrittenen zur Untersuchung reifender Blütenpollen, die jedoch noch nicht freigesetzt werden, verwendet. Wie in Abbildung 18 A zu erkennen ist, sind junge Wildtyp-Antheren mit Tetraden gefüllt, wobei drei der vier Zellen in einer Ebene sichtbar

sind, während die vierte Zelle oberhalb oder unterhalb der aufgenommenen Ebene liegt. Die vier Zellen werden tetraederförmig innerhalb ihrer Callosehülle zusammengehalten. Reife Wildtyp-Antheren enthalten Mikrosporen einheitlicher Form und Größe. Im Vergleich dazu enthalten Antheren der Linien *spo11-1*, *spo11-2*, *spo11-1/spo11-2*, *brca2(IV)/(V)* und *rad51* zum Zeitpunkt der Tetradenbildung „Polyaden“ mit einer sehr variablen Anzahl an Zellen, meist jedoch mehr als vier (Abb. 18 B1, C1, D1, E1, F1). Zellen innerhalb der Polyaden unterscheiden sich beträchtlich in Form und Größe. Dagegen enthalten Antheren von *top3α*-Mutanten (Abb. 18 G1) Polyaden mit einer verminderten Anzahl an Zellen, die meist als „Diaden“ und „Triaden“ hervortreten. Aus den Polyaden der *spo11-1*-, *spo11-2*- und *spo11-1/spo11-2*-Mutanten gehen Mikrosporen hervor, die sich in Form und Größe innerhalb einer Anthere sehr unterscheiden (Abb. 18 B2, C2, D2). Das Gleiche gilt für Pollen der *top3α*-Mutante; hier fällt zusätzlich auf, dass im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Anzahl an Mikrosporen gebildet werden (Abb. 18 G2). Zieht man in Betracht, dass sich aus jeder Zelle der Tetrade bzw. Polyade ein Pollenkorn entwickelt, so kann die verminderte Menge an Mikrosporen auf die geringere Zellzahl innerhalb der *top3α*-Diaden/Triaden zurückgeführt werden. Ein etwas anderes Erscheinungsbild zeigen reife Antheren von *brca2(IV)/(V)*- und *rad51*-Antheren. Hier sind die Blütenpollen innerhalb einer Anthere zwar mehr oder weniger gleich groß, doch deutlich kleiner als beim Wildtyp. Sie liegen in einer relativ hohen Zahl vor und weisen einen durchweg hohen Degenerationsgrad auf.

Obwohl Staubblätter der verschiedenen Mutanten auf morphologischer Ebene einen ähnlichen Phänotyp besitzen, können bezüglich der Bildung von Mikrosporen Unterschiede festgestellt werden. Durch Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen der Pollenmutterzellen (s. Kapitel 3.3.4) kann die Ursache dieser Differenzen verdeutlicht werden.

3.3.3 Die Entwicklung der Samenanlagen

Die Untersuchung der Embryosackentwicklung erfolgte durch Fixierung von Blütenknospen unterschiedlicher Entwicklungsstufen, Isolierung der Samenanlagen und anschließender DIC-Mikroskopie. Beginnend mit Samenanlagen aus Stadium 9 der Blütenentwicklung bis hin zu bereits befruchteten Embryosäcken wurde für *Arabidopsis*-Col-0 eine Entwicklungsfolge erstellt (Abb. 19). In Abbildung 19 A und B sind junge Samenanlagen zu sehen, die jeweils eine Megasporenmutterzelle (MMZ) enthalten. In Abbildung 19 B ist das beginnende Integument-Wachstum bereits deutlich zu erkennen. Die MMZ durchläuft zwei meiotische Teilungen (Abb.

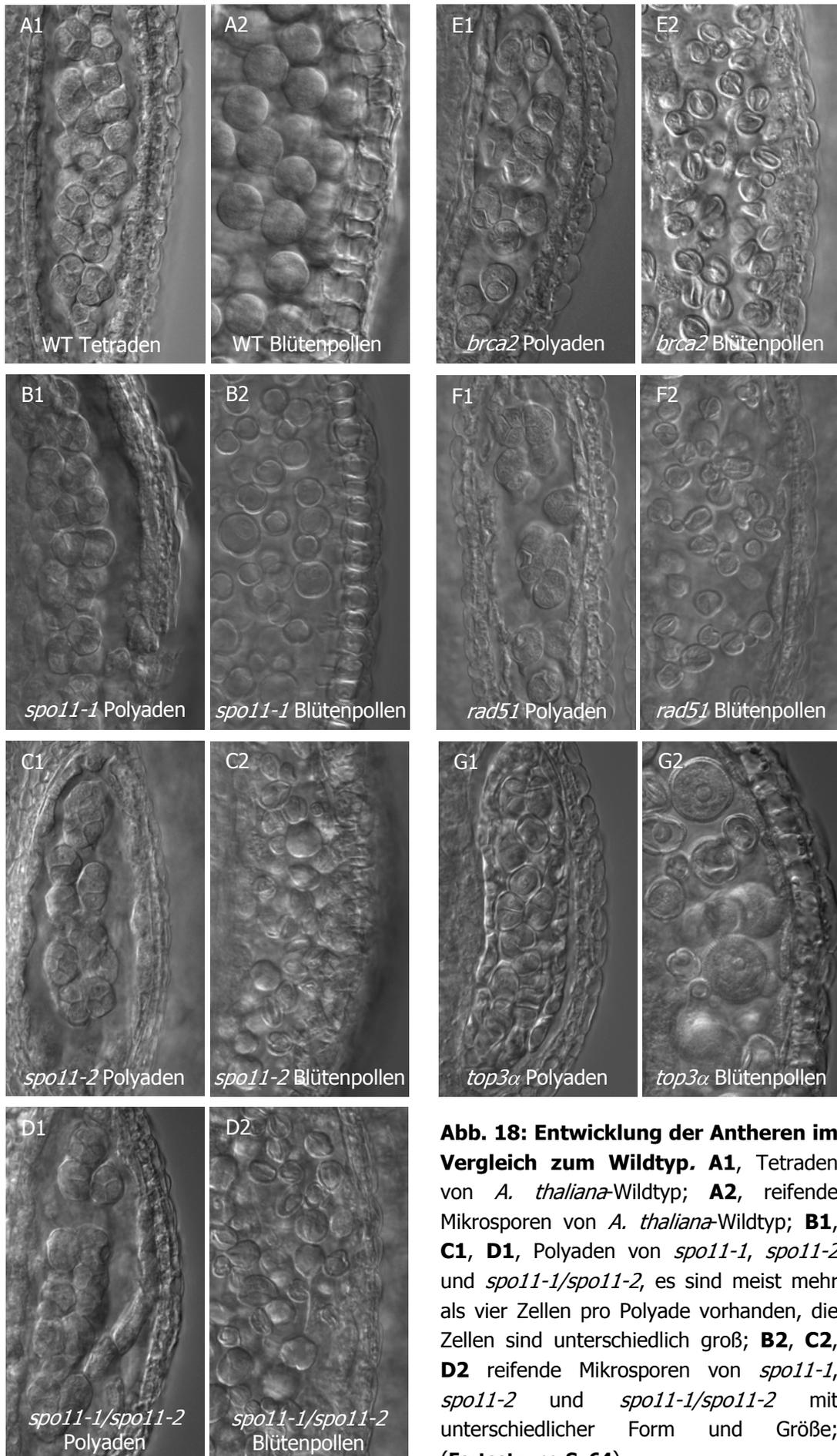


Abb. 18: Entwicklung der Antheren im Vergleich zum Wildtyp. **A1**, Tetraden von *A. thaliana*-Wildtyp; **A2**, reife Mikrospermen von *A. thaliana*-Wildtyp; **B1**, **C1**, **D1**, Polyaden von *spo11-1*, *spo11-2* und *spo11-1/spo11-2*, es sind meist mehr als vier Zellen pro Polyade vorhanden, die Zellen sind unterschiedlich groß; **B2**, **C2**, **D2**, reife Mikrospermen von *spo11-1*, *spo11-2* und *spo11-1/spo11-2* mit unterschiedlicher Form und Größe; (Fortsetzung S. 64)

19 C, D), aus denen vier haploide Zellen hervorgehen (Abb. 19 D). Während drei dieser Zellen degenerieren, entwickelt sich eine zur Megaspore weiter (Abb. 19 E). Die meiotischen Teilungen und die Entstehung der Megaspore sind von einem deutlichen Wachstum der Integumente begleitet, die im Zustand des einkernigen Embryosacks (Abb. 19 E) den Nucellus vollständig umschließen. Nun durchläuft die Megaspore drei mitotische Teilungen, aus denen ein zweikerniger (Abb. 19 F) ein vierkerniger (Abb. 19 G) und schließlich ein achtkerniger Embryosack (Abb. 19 H) hervorgeht. Sobald die acht Kerne ihre endgültige Position eingenommen haben (s. auch Abb. 7) und die Cytokinese durchlaufen wurde, ist der Embryosack befruchtungsfähig. Nach der Befruchtung sind Eizelle und der nun triploide Polkern deutlich zu erkennen (Abb. 19 I); Antipoden und Synergiden sind zu diesem Zeitpunkt bereits degeneriert. Aus der befruchteten Eizelle entwickelt sich ein Embryo, wie hier am Beispiel des sog. Oktantstadiums dargestellt (Abb. 19 J).

Bei sterilen Mutanten ist mit der hier verwendeten Methode eine genaue Definition der Entwicklungsstufen, vor allem während der meiotischen Phase, nicht möglich. Der Entwicklungszustand der Integumente gibt jedoch einen Hinweis darauf, in welchem Stadium sich die entsprechende Samenanlage befindet. Die Samenanlagen der Mutanten *spo11-1*, *spo11-2*, *spo11-1/spo11-2*, *brca2(IV)/(V)*, *rad51* und *top3 α* wurden auf diese Weise mit Wildtyp-Ovarien verglichen. Bereits während der Entwicklungsphase, die beim Wildtyp den meiotischen Teilungen entspricht, kann bei keiner der Mutanten eine klare Differenzierung in erste und zweite Teilung getroffen werden. In wenigen Fällen sind Meioseprodukte erkennbar, die bezüglich ihrer Zellzahl jedoch sehr variieren. Aus den Teilungsvorgängen geht bei allen untersuchten Mutanten eine Megaspore hervor, die vermutlich einen aberranten Chromosomensatz enthält. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass sich diese Zelle im weiteren Verlauf des Reifungsprozesses nicht mehr teilt. Das umliegende Gewebe und die Integumente entwickeln sich während dieser Zeit normal weiter, so dass eine reife Samenanlage mit degeneriertem Embryosack entsteht. Das Schicksal der einzelnen Zelle ist dabei beliebig, da sie in einigen Fällen während des gesamten Reifeprozesses erhalten bleibt (Abb. 20 B1-G1, Pfeile) und z.T. im Laufe des Entwicklungsprozesses degeneriert (Abb. 20 B2-G2).

Fortsetzung Abb. 18: E1, F1, Polyaden von *brca2(IV)/(V)* und *rad51*, es sind meist mehr als vier Zellen unterschiedlicher Größe vorhanden; **E2, F2**, reifende, degenerierte Mikrosporen von *brca2(IV)/(V)* und *rad51*; **G1**, Diaden und Triaden von *top3 α* ; **G2**, reifende Mikrosporen von *top3 α* , die Mikrosporen liegen in einer deutlich geringeren Zellzahl im Vergleich zum Wildtyp vor.

Die Degeneration des Embryosackes ist während des reifen Stadiums deutlich zu erkennen und ist daher stellvertretend für die Fehlentwicklung während des gesamten Reifeprozesses der Samenanlagen dargestellt (Abb. 20).

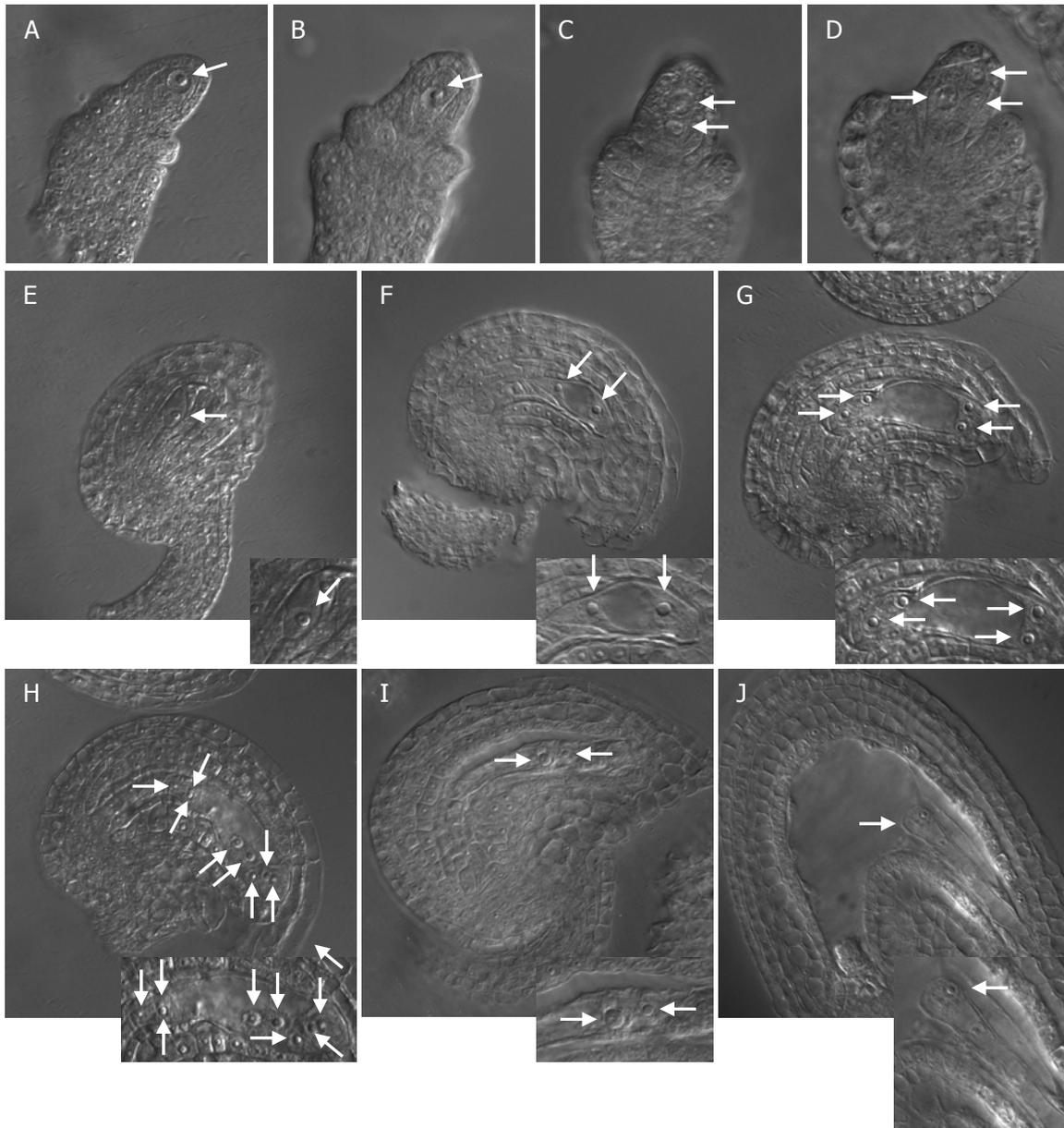
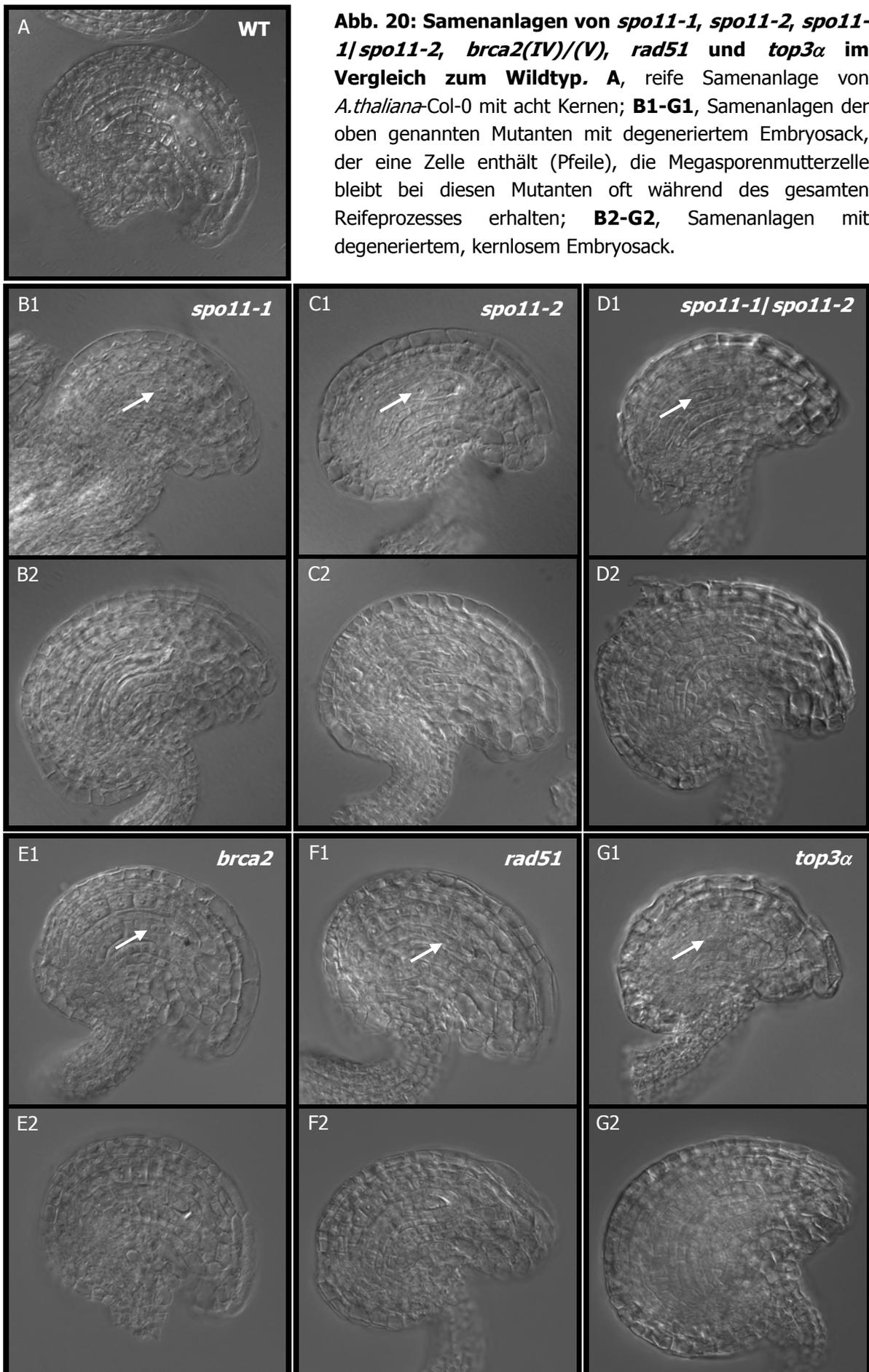


Abb. 19: Entwicklung von Samenanlagen bei *A. thaliana*-Col-0. **A**, Samenanlage mit Megasporenmutterzelle (MMZ); **B**, Samenanlage mit MMZ und beginnendem Integumentwachstum; **C**, Meiose I; **D**, Meiose II, der vierte Kern befindet sich in einer anderen Ebene; **E**, die Integumente umschließen den Nucellus, der Embryosack enthält die Megaspore; **F**, erste mitotische Teilung, der Embryosack enthält zwei Kerne; **G**, zweite mitotische Teilung, der Embryosack enthält vier Kerne; **H**, dritte mitotische Teilung, der Embryosack enthält acht Kerne, die fast ihre endgültige Position eingenommen haben; **I**, Embryosack mit befruchteter Eizelle und triploidem Embryosackkern; **J**, Samenanlage mit Embryo im Oktantstadium. Die Pfeile zeigen jeweils die Position der Kerne bzw. des Embryos an



3.3.4 Meiose in Pollenmutterzellen

Je nachdem zu welchem Zeitpunkt ein Protein in den Prozess der Meiose bzw. meiotischen Rekombination eingreift entstehen nach Ausschalten dieser Proteine charakteristische chromosomale Aberrationen. So führt das Ausschalten von SPO11-1 (Grelon et al., 2001) und SPO11-2 (Stacy et al., 2006) zur Aufhebung der Bivalentbildung, was in Störungen während den folgenden Segregationsprozessen resultiert. Es wird vermutet, dass diese Defekte durch das Fehlen der DSB-Bildung verursacht werden. Das Ausschalten von RAD51 dagegen führt zu Fragmentierungen der Chromosomen (Li et al., 2004), die vermutlich durch SPO11-induzierte DNA-Strangbrüche entstehen. Die DSBs werden nicht zu Rekombinationsintermediaten weiterentwickelt, da der Rekombinationsprozess bereits während der Homologie-Suche zum Erliegen kommt. Vor der Beschreibung einzelner Mutanten soll ein Überblick über meiotische Strukturen, wie sie in Meiozyten des Wildtyps vorhanden sind, gegeben werden.

3.3.4.1 Meiose in *A. thaliana*-Wildtyp

Zur näheren Charakterisierung der Pollenentwicklung wurden Meiozyten Fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden Blütenknospen der Entwicklungsstadien sieben bis neun fixiert und isoliert und Pollenmutterzellen durch leichten Druck aus den Antheren freigesetzt. Diese wurden mit DAPI-Lösung versetzt, um Chromosomen sichtbar zu machen.

Abbildung 21 zeigt die Meiose von Blütenpollen einer Wildtyppflanze vom Stadium der Pollenmutterzelle bis zum Tetradenstadium. Eine ausführliche Untersuchung und Interpretation der Meiose in *A. thaliana* wurde von Ross et al. (1996) durchgeführt. Hier sollen nur die wichtigsten Stadien dargestellt werden.

Die meiotische Prophase beginnt, wenn Interphase-Zellen in das Leptotän übergehen und die Chromosomen durch beginnende Kondensationsprozesse das Erscheinungsbild langer dünner Fäden annehmen (Abb. 21 A). Charakteristisch für dieses Stadium ist das Auftreten chromosomaler Verdickungen stärker kondensierter Chromosomenabschnitte, die mikroskopisch als Chromomere sichtbar sind (Pfeil) (Egel, 1975). Während des Zygotäns (Abb. 21 B) findet die Paarung homologer Chromosomen statt, an deren Kontaktstellen die Ausbildung des synaptonemalen Komplexes beginnt (Moses, 1969; von Wettstein et al., 1984; Albini, 1994; Heyting, 1996; siehe auch Reviews Roeder, 1997; Zickler und Kleckner, 1999). In Abb. 21 C ist

die beginnende Synapsis zu erkennen, die entlang der gesamten Chromosomen fortschreitet und im Stadium des Pachytäns abgeschlossen ist (Abb. 21 D). Homologe Chromosomen liegen nun als Bivalente in einer stabilen Assoziation vor. Während des Diplotäns löst sich diese Verbindung wieder auf, die Homologen bleiben jedoch über Chiasmata miteinander verbunden (Abb. 21 E). Bis zum Ende der Prophase kondensieren die Chromosomen weiter, bis sie während der Diakinese aufgrund der hohen Dichte als längliche, ovale oder kugelförmige Strukturen zu

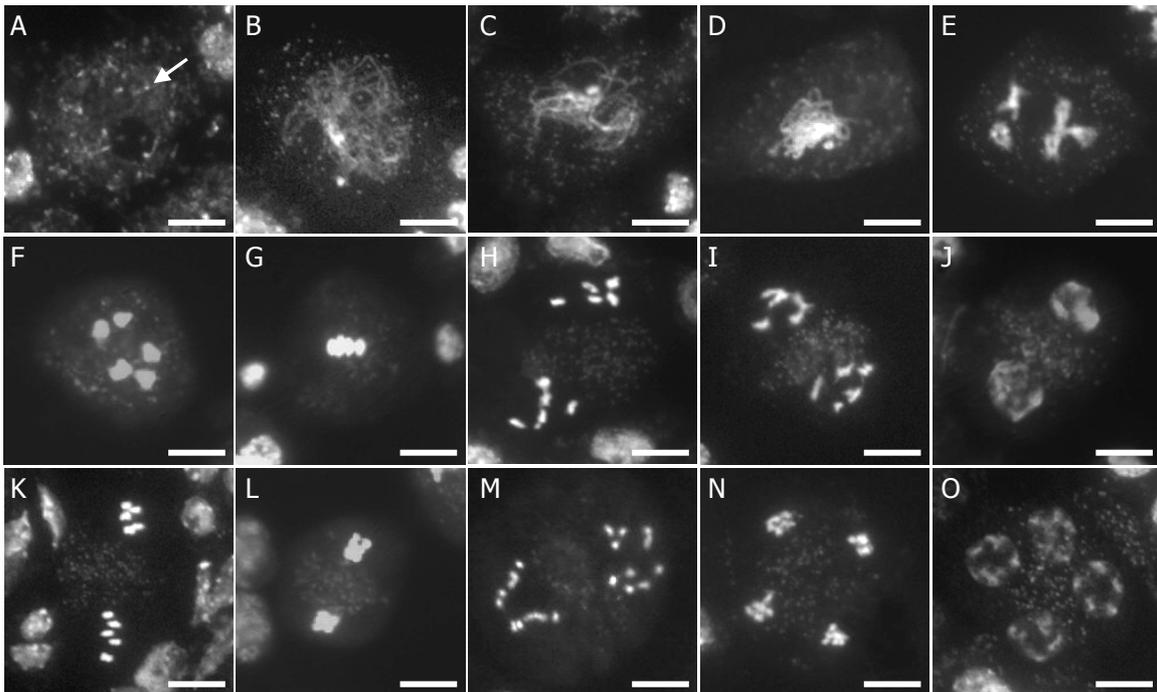


Abb. 21: Meiose in *A-thaliana-Col-0*-Meiozyten. **A**, Leptotän, beginnende Kondensation der Chromosomen, Chromosomenverdickungen sind als Chromomere zu erkennen (Pfeil); **B**, frühes Zygotän, Paarung der homologen Chromosomen; **C**, spätes Zygotän, die Synapsis beginnt zwischen gepaarten Homologen; **D**, Pachytän, die Synapsis der homologen Chromosomen ist vollständig; **E**, Diplotän, der synaptonemale Komplex löst sich auf, homologe Chromosomen streben auseinander und werden über Chiasmata weiterhin zusammengehalten; **F**, Diakinese, weitere Kondensation der Chromosomen, die Chromosomen lösen sich von der Kernhülle; **G**, Metaphase I, die Chromosomen sind maximal kondensiert und ordnen sich in der Äquatorialebene der Zelle an; **H**, Anaphase I, Segregation der Homologen, je fünf Chromosomen wandern zu gegenüberliegenden Polen; **I**, Telophase I, die Chromosomen beginnen zu dekondensieren; **J**, Telophase I, vollständige Dekondensation der Chromosomen; **K**, Metaphase II, die Chromosomen ordnen sich erneut in den Äquatorialebenen an; **L-N**, Anaphase II, von der beginnenden Segregation der Schwesterchromatiden bis zur Aufteilung auf vier Pole, es entstehen vier Gruppen, die jeweils fünf Chromatiden enthalten; **O**, Telophase II, Dekondensation der Chromatiden. Es schließt sich eine Cytokinese an, die zur Bildung einer Tetrade führt.

Balken: 10 μ m

erkennen sind (Abb. 21 F). Nach Beendigung der Prophase ordnen sich die homologen Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle an und gehen in die erste Metaphase über (Abb. 21 G). Die Chromosomen sind zu diesem Zeitpunkt maximal kondensiert und für die erste meiotische Teilung vorbereitet. Während Anaphase I werden homologe Chromosomen voneinander getrennt und wandern jeweils zu gegenüberliegenden Polen (Abb. 21 H). Nach der Segregation findet im Stadium der ersten Telophase eine leichte Dekondensation der Chromosomen statt (Abb. 21 I, J). Abbildung 21 I zeigt den Übergang von der Anaphase I zur Telophase I, die in Abbildung 21 J abgeschlossen ist. Mit der Telophase I endet die erste Teilung; die Chromosomen wandern erneut in Richtung Äquatorialebene und gehen in die zweite Metaphase über (Abb. 21 K). Charakteristisch während der ersten Teilung ist die Anordnung der Zellorganellen zwischen den neu gebildeten Kernen, die während Anaphase I beginnt und bis zur zweiten Metaphase beibehalten wird (Abb. 21 H, I, J, K). Es folgt eine zweite Anaphase, die nun zur Trennung der Schwesterchromatiden führt (Abb. 21 L, M, N). Die Abbildungen 21 L bis N zeigen eine fortschreitende Anaphase II bis zur Bildung von vier Chromatidgruppen, bestehend aus jeweils fünf Chromatiden (Abb. 21 N). Die zweite Telophase führt zur Dekondensation der Chromatiden (Abb. 21 O). Aus ihr geht nach anschließender Cytokinese eine Tetrade hervor, deren vier Zellen sich jede zur Mikropore weiterentwickelt und schließlich zum Blütenpollen heranreift.

3.3.4.2 In *spo11*-Mutanten findet keine Bivalentbildung statt

Anders als bei *A. thaliana* Wildtyp wurde bei der *spo11-1*-Mutante während der Prophase keine dem Pachytän-Stadium entsprechende Chromosomenstruktur gefunden (Abb. 22 A). Während beim Wildtyp in Diplotän und Diakinese fünf Homologenpaare erscheinen, treten bei *spo11-1* in diesen Stadien bis zu zehn Chromosomensignale auf (Abb. 22 B, C), was bedeutet, dass diese Mutante keine Bivalentbildung eingeht. Während der ersten Metaphase findet keine exakte Ausrichtung der Univalente im Bereich der Äquatorialebene statt, was möglicherweise durch Störungen während der Kinetochorbildung und Mikrotubuli-Anheftung bedingt ist (Abb. 22 D). Dennoch durchläuft die Zelle die erste Anaphase, bei der es jedoch, wahrscheinlich aufgrund fehlender Chiasmata, zu einer zufälligen und ungleichen Segregation der Univalente kommt (Abb. 22 E). In einigen Fällen werden einzelne Chromosomen nicht in den Segregationsprozess mit einbezogen, wie in Abbildung 22 F zu sehen ist (Pfeil). Während der zweiten Metaphase sind

nach dem ersten Teilungsprozess nicht zwei Gruppen mit jeweils fünf Chromosomensignalen zu finden (wie in Abb. 21 K), sondern zwei oder mehr Gruppen mit einer variablen Anzahl an Chromosomen (Abb. 22 G). Die ungleichmäßige Segregation setzt sich während der zweiten Teilung fort, in der Chromatiden unregelmäßig auf vier der mehr Pole verteilt werden (Abb. 22 H). Das Resultat ist die Bildung von Polyaden statt Tetraden, die Tochterkerne mit einem aberranten Chromosomensatz enthalten (Abb. 22 I).

Die mikroskopische Analyse von *spo11-2*- und *spo11-1/spo11-2*-Meiozyten hat gezeigt, dass die chromosomalen Abweichungen dieser Mutanten denen der *spo11-1*-Mutante entsprechen. In allen drei Fällen ist die Synapsis der homologen Chromosomen aufgehoben (Abb. 22 B, C, D; 23 B, C, D; 24 B, C, D) was zu einer unregelmäßigen Aufteilung von Chromosomen und Chromatiden während Meiose I (Abb. 22 E; 23 E; 24 E) und Meiose II (Abb. 22 H; 23 H; 24 H) führt. Anstelle von Tetraden entstehen bei allen drei Mutanten Polyaden mit einer variablen Anzahl an Zellen und irregulärem DNA-Gehalt (Abb. 22 I; 23 I; 24 I).

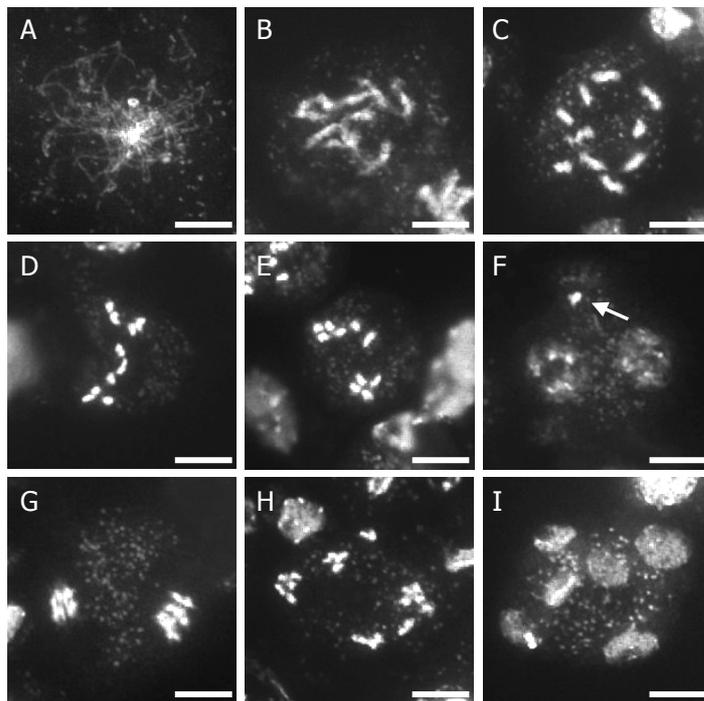


Abb. 22: Meiose in Meiozyten der *spo11-1*-Mutante. **A**, Zygotän oder Pachytän, die beiden Stadien sind aufgrund der fehlenden Bivalentbildung kaum zu unterscheiden; **B**, Diplotän, es hat keine Synapsis der homologen Chromosomen stattgefunden, die Chromosomen liegen als Univalente vor, es sind mehr als fünf Chromosomengruppen zu erkennen; **C**, Diakinese, weitere Kondensation der Chromosomen, alle zehn Univalente sind zu erkennen; **D**, Metaphase I, eine eindeutige Anordnung der Chromosomen innerhalb der Äquatorialebene findet nicht statt; **E**, Anaphase I, ungleichmäßige Segregation der Chromosomen, im Beispiel hier wandern vier Chromo-

somen zum unteren Pol und sechs zum oberen; **F**, Telophase I, vollständige Dekondensation der Chromosomen; zum Teil werden einige Chromosomen nicht in die Kernbildung miteinbezogen (Pfeil); **G**, Metaphase II, die Chromosomen ordnen sich in einer ungleichen Anzahl in den Äquatorialebenen an; **H**, Anaphase II, die unregelmäßige Segregation setzt sich während der Aufteilung der Chromatiden fort; **I**, Telophase II, Dekondensation der Chromatiden, die anschließende Cytokinese führt zur Bildung von Polyaden mit einer variablen Anzahl an Zellen, die sich bezüglich Form, Größe und DNA-Gehalt unterscheiden. *Balken: 10 μ m*

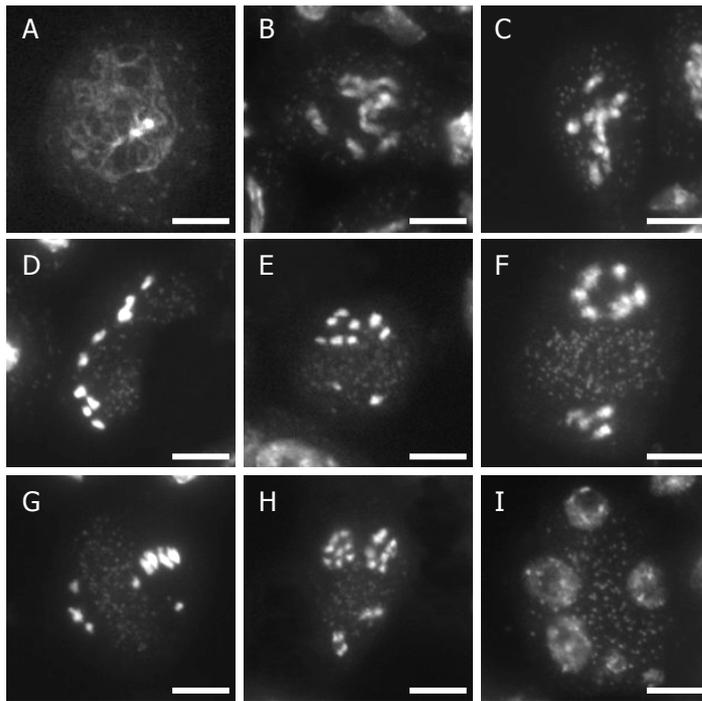


Abb. 23: Meiose in Meiozyten der *spo11-2*-Mutante.

Der Phänotyp entspricht dem der *spo11-1*-Mutante; **A**, Zygotän oder Pachytän, es findet keine Bivalentbildung statt; **B**, Diplotän, die Chromosomen liegen als Univalente vor, es sind mehr als fünf Chromosomengruppen zu erkennen; **C**, Diakinese, weitere Kondensation der Chromosomen, auch hier sind mehr als fünf Chromosomensignale zu erkennen; **D**, Metaphase I, eine eindeutige Anordnung der Chromosomen innerhalb der Äquatorialebene findet nicht statt; **E**, Anaphase I, ungleichmäßige Segregation der Chromosomen, im Beispiel hier wandern zwei Chromosomen zum unteren Pol und acht

zum oberen; **F**, Telophase I, Dekondensation der Chromosomen; die ungleichmäßige Aufteilung ist deutlich zu erkennen; **G**, Metaphase II, die Chromosomen ordnen sich in einer ungleichen Anzahl in den Äquatorialebenen an; **H**, Anaphase II, die unregelmäßige Segregation setzt sich während der Aufteilung der Chromatiden fort; **I**, Telophase II, Dekondensation der Chromatiden, die anschließende Cytokinese führt zur Bildung von Polyaden mit einer variablen Anzahl an Zellen, die sich bezüglich Form, Größe und DNA-Gehalt unterscheiden. *Balken: 10 µm*

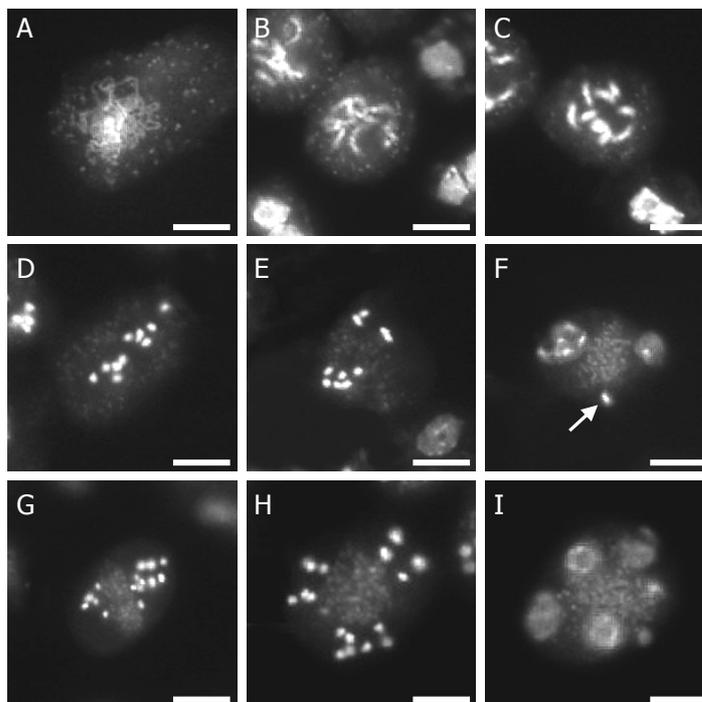


Abb. 24: Meiose in Meiozyten der *spo11-1/spo11-2*-Mutante.

Der Phänotyp entspricht dem der *spo11-1*- und *spo11-2*-Mutanten; **A**, Zygotän/Pachytän; **B**, Diplotän, die Homologen liegen als Univalente vor; **C**, Diakinese, weitere Kondensation der Univalente; **D**, Metaphase I, es kommt zu Störungen während der Anordnung der Chromosomen innerhalb der Äquatorialebene; **E**, Anaphase I, ungleichmäßige Segregation der Chromosomen, im Beispiel hier wandern sechs Chromosomen zum unteren Pol und vier zum oberen; **F**, Telophase I, vollständige Dekondensation der Chromosomen; nicht alle Chromosomen werden in die Kernbildung miteinbezogen (Pfeil);

G, Metaphase II, die Chromosomen ordnen sich in einer ungleichen Anzahl in den Äquatorialebenen an; **H**, Anaphase II, unregelmäßige Segregation der Chromatiden; **I**, Telophase II, Dekondensation der Chromatiden und Bildung von Polyaden. *Balken: 10 µm*

3.3.4.3 Das Ausschalten von BRCA2 führt zur Fragmentierung der Chromosomen

Wie bei SPO11-Mutanten konnte auch bei der *brca2(IV)/(V)*-Mutante kein typisches Pachytän-Stadium (Abb. 25 A) beobachtet werden. Was bedeutet, dass auch durch eine BRCA2-Mutation die Bildung von Bivalenten aufgehoben wird. Dennoch unterscheiden sich chromosomale Aberrationen der *brca2(IV)/(V)*-Mutante beträchtlich von denen der SPO11-Mutanten. Bereits während Diplotän- und Diakinese-Stadien (Abb. 25 B, C; Pfeil) kommt es zu Chromosomenfragmentierungen, die während der ersten meiotischen Teilung noch klarer in Erscheinung treten. Deutliche Fragmentierungen konnten während der ersten Metaphase (Abb. 25 D), vor allem jedoch während Anaphase I (Abb. 25 E; Pfeile) beobachtet werden. Oft zeigt sich während dieses Stadiums die Bildung von Chromosomenbrücken, die durch Verknüpfungen von Chromosomenbereichen entstehen (nicht gezeigt). Einige Fragmente werden nach der Bildung zweier Tochterkerne in der ersten Telophase nicht in die Kernbildung miteinbezogen (Abb. 25 F, Pfeile). In Folge der entstandenen Chromosomenbruchstücke und beliebigen Segregation richten sich während der zweiten Metaphase zwei oder mehr Chromosomengruppen

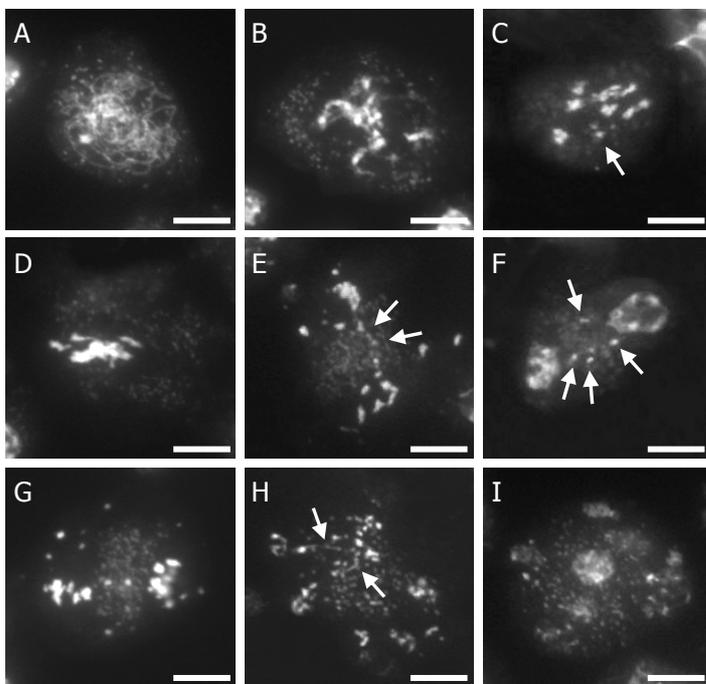


Abb. 25: Meiose in Meiozyten der *brca2(IV)/(V)*-Mutante. **A**, Zygotän/Pachytän; **B**, Diplotän, es wurden keine Bivalente gebildet; **C**, Diakinese, weitere Kondensation der Chromosomen, bereits in diesem Stadium sind Fragmentierungen zu erkennen (Pfeil); **D**, Metaphase I, die Chromosomen sind maximal kondensiert, nicht alle Chromosomen und Fragmente ordnen sich in der Äquatorialebene an; **E**, Anaphase I, Chromosomen werden ungleichmäßig auf die beiden Tochterkerne aufgeteilt, Chromosomenfragmentierungen sind deutlich zu erkennen (Pfeile); **F**, Telophase I, vollständige Dekondensation der Chromosomen,

auch hier sind einzelne Chromosomenbruchstücke zu erkennen (Pfeile); **G**, Metaphase II, Chromosomen und Chromosomenbruchstücke ordnen sich in den Äquatorialebenen an; **H**, Anaphase II, Fragmentierungen und Brückenbildungen (Pfeile) sind deutlich zu erkennen; **I**, Telophase II, Chromatiden dekondensieren, Chromosomenfragmente sind zwischen den Tochterkernen verstreut. *Balken: 10 µm*

mit irregulärem Chromosomengehalt in Metaphaseplatten aus (Abb. 25 G). Dennoch geht die Zelle die zweite meiotische Teilung ein, die den hohen Grad der Chromosomenfragmentierung und das Auftreten von Chromosomenbrücken noch einmal nachdrücklich erkennen lässt (Abb. 25 H, Pfeile). Wie bei SPO11-Mutanten kommt es auch bei *brca2(IV)/(V)* zur Bildung von Polyaden, die neben der abweichenden Anzahl an Tochterkernen einen hohen Gehalt einzelner Chromosomenbruchstücke aufweisen (Abb. 25 I).

3.3.4.4 Der Phänotyp der *rad51*-Mutante entspricht dem der *brca2*-Mutante

Wie bei den bereits beschriebenen Mutanten findet auch nach Ausschalten von RAD51 keine Synapsis der Homologen statt, weshalb auch bei *rad51* keine Pachytänstadien zu finden waren. (Abb. 26 A). Während der Kondensation der Chromosomen, die bis zur Metaphase I kontinuierlich zunimmt, wird deutlich, dass keine Bivalentbildung stattgefunden hat (Abb. 26 B, C). Erste Fragmentierungen sind vor allem während der ersten Metaphase zu erkennen (Abb. 26 C, Pfeile). Vor allem während der ersten Teilung wird die Bildung von Chromosomenbruchstücken deutlich (Abb. 26 D, E; Pfeil), die sich während der Segregation der Chromatiden innerhalb der II. Meiose fortsetzt (Abb. F, G, H). Die beiden asymmetrischen Teilungen führen, wie für die bisher beschriebenen Mutanten bereits gezeigt, zur Bildung von Polyaden, die aufgrund der Chromosomenfragmentierungen zudem einen hohen Gehalt chromosomaler Bruchstücke enthalten (Abb. 26 H). Damit sind die Beobachtungen, die während der Analyse von *brca2(IV)/(V)*- und *rad51*-Meiozyten gemacht wurden, im Wesentlichen identisch.

3.3.4.5 Der *top3α*-Phänotyp unterscheidet sich von dem der anderen Mutanten

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Mutanten zeigt die *top3α*-Mutante einige wesentliche Unterschiede. So wird die Prophase bis einschließlich des Pachytän-Stadiums fehlerfrei durchlaufen (Abb. 27 A, B), was bedeutet, dass Chromosomenpaarung und Synapsis nicht aufgehoben werden. Erste Defekte sind bei dieser Mutante während des Diplotäns (Abb. 27 C) zu beobachten, die bei weiterer Kondensation der Chromosomen noch deutlicher werden.

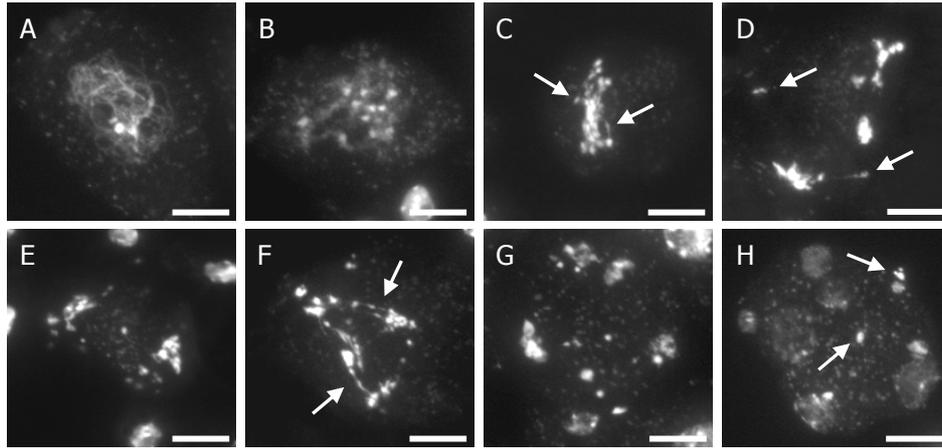


Abb. 26: Meiose in Meiozyten der *rad51*-Mutante. **A**, Zygotän/Pachytän; **B**, Diplotän, keine Bivalent-Bildung; **C**, Metaphase I, keine genaue Ausrichtung der Chromosomen in der Äquatorialebene, die Anordnung ist unstrukturiert, es treten erste Fragmentierungen auf (Pfeile); **D**, Anaphase I, es sind Chromosomenbruchstücke zu erkennen (Pfeile), die Chromosomen werden ungleichmäßig auf die beiden Tochterkerne aufgeteilt; **E**, Übergang von Anaphase I zu Telophase I; **F**, Anaphase II, Fragmentierungen und Brückenbildungen (Pfeile) sind deutlich zu erkennen; **G**, Übergang Anaphase II zu Telophase II; **H**, Telophase II, Chromatiden decondensieren, einzelne Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke sind zwischen den Tochterkernen zu erkennen (Pfeile). *Balken: 10 µm*

Während der Meiose von Wildtyp-Zellen wird im Laufe des Diplotäns der synaptonemal Komplex, der die homologen Chromosomen bis hier zusammenhält, aufgelöst und Chromosomenpaare bleiben über Chiasmata verbunden. Reparaturprozesse, die während der vorhergehenden Phasen zur Bildung von Rekombinationsintermediaten und damit zu Verknüpfungen der DNA-Stränge führten, müssen dazu bei Eintritt ins Diplotän aufgelöst sein. Bei *top3α* scheint es demnach zu Störungen während der Trennung der Homologen am Ende der Prophase zu kommen. Deutlicher wird dieser Effekt nach zunehmender Chromosomenkondensation während der Diakinese (Abb. 27 D) und der ersten Metaphase (Abb. 27 E). Dieser Defekt führt während Anaphase I zu schweren Fragmentierungen der Chromosomen (Abb. 27 F). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Mutanten durchläuft *top3α* die zweite meiotische Teilung nicht mehr. Nach Abschluss der Meiose sind bei *top3α* anstelle der bisher beobachteten Polyaden, die meist mehr als vier Zellen enthielten, „Diaden“ und „Triaden“ zu finden (Abb. 27 G, H).

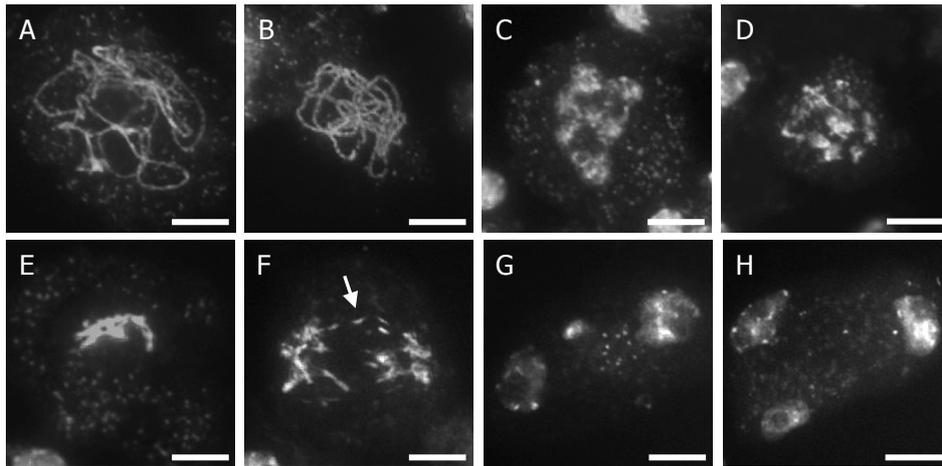


Abb. 27: Meiose in Meiozyten der *top3α*-Mutante. **A**, Zygotän; **B**, Pachytän, homologe Chromosomen liegen als Bivalente vor; **C**, Diplotän, der synaptonemale Komplex löst sich auf, Homologe bleiben über Chiasmata verbunden, *top3α* zeigt Störungen während des Auseinanderstrebens der Chromosomen; **D**, Diakinese, weitere Kondensation der Chromosomen, erste Fragmentierungen, die durch Defekte während des Diplotäns entstehen, sind zu erkennen; **E**, Metaphase I, Chromosomen ordnen sich völlig unstrukturiert in der Äquatorialebene an; **F**, Anaphase I, es kommt zu Chromosomenfragmentierungen und zur Brückenbildung (Pfeil); **G**, **H**, Telophase I, Dekondensation der Chromosomen, die Meiose bricht nach der ersten Teilung ab, es entstehen meist Diaden (G) und Triaden (H). *Balken 10 μm*

3.3.4.6 Kreuzungen von Mutanten verschiedener Rekombinationsfaktoren

Kreuzungen von Mutanten verschiedener Rekombinationsfaktoren können Hinweise auf die Abfolge der Funktion zweier Proteine geben. Li et al. (2004) haben gezeigt, dass der *rad51*-Phänotyp durch *spo11-1* aufgehoben werden kann. SPO11-1 scheint demnach eine RAD51 vorgelagerte Funktion zu erfüllen. Eine *spo11-2/rad51*-Doppelmutation zeigte ebenfalls einen der *spo11-2*-Mutanten entsprechenden Phänotyp. Chromosomenfragmentierungen der *rad51*-Mutante wurden weitgehend aufgehoben. Die Prophase ist durch das Auftreten ungepaarter homologer Chromosomen gekennzeichnet (Abb 28. A-D), die während der folgenden Teilungen zur ungleichen Segregation von Chromosomen (Abb. 28 E, F) bzw. Chromatiden (Abb. 28 G-I) führt. Im Gegensatz zur *spo11-1/rad51*-Doppelmutation, die den *rad51*-Phänotyp vollständig aufhebt (Li et al., 2004), sind bei *spo11-2/rad51*-Mutanten in einigen Fällen Fragmentierungen zu beobachten, wie sie hier während Metaphase I (Abb. 28 D; Pfeil) und Anaphase I (Abb. 28 E)

dargestellt sind. Erwartungsgemäß wären entsprechend dem *spo11-2*-Phänotyp nicht mehr als 10 Chromosomensignale zu finden. Wie in Abb. 28 D und E jedoch zu sehen ist, können hier mehr als 10 Signale gezählt werden. Polyaden enthalten keine Chromosomenbruchstücke, wie es bei *rad51* der Fall ist. Somit scheinen auch DSBs, die durch SPO11-2 verursacht werden, Voraussetzung für RAD51-vermittelte Rekombinationsprozesse zu sein.

Auch der Phänotyp von *top3α* kann durch ein zusätzliches Ausschalten der SPO11-2-Funktion weitgehend aufgehoben werden (Abb. 29 A-H). Schwere chromosomale Fragmentierungen wie sie bei *top3α* zu beobachten sind, konnten bei der *top3α/spo11-2*-Doppelmutante nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu *top3α* ist die Doppelmutante nicht zur Bivalentbildung fähig. Während des Diplotäns (Abb. 29 B) und der Diakinese (Abb. 29 C) konnte die Bildung von Univalenten anstelle von Bivalenten beobachtet werden, die jedoch in den meisten Fällen keine Chromosomenfragmente aufweisen. Wie *spo11-2* zeigt auch die Doppelmutante eine ungleiche Segregation der Chromosomen während der ersten meiotischen

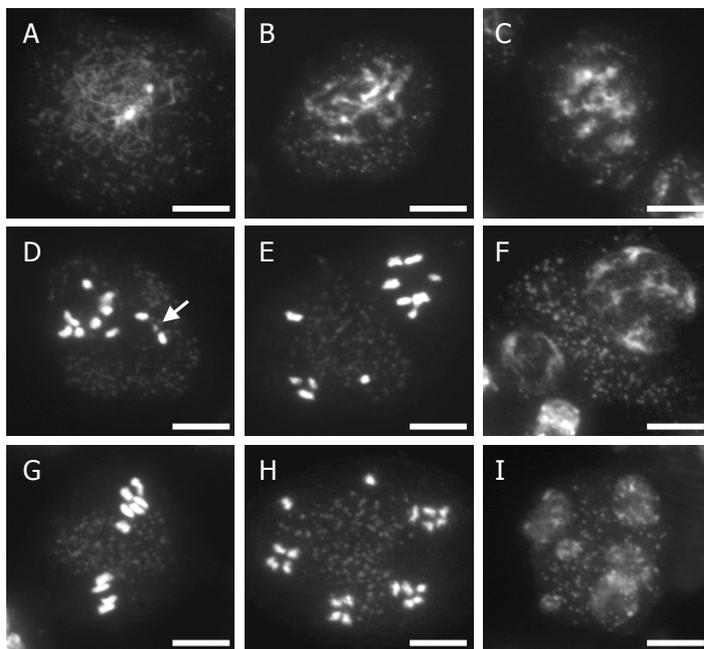


Abb. 28: Meiose in Meiozyten der *spo11-2/rad51*-Doppelmutante. Der *rad51*-Phänotyp kann durch eine zusätzliche SPO11-2-Mutation weitgehend aufgehoben werden; **A**, Zygotän/Pachytän; **B**, Diplotän, Chromosomen liegen als Univalente vor; **C**, Diakinese, weitere Kondensation der Univalente; **D**, Metaphase I, die Chromosomen ordnen sich nicht in der Metaphaseplatte an, z.T. sind Fragmentierungen der Chromosomen zu erkennen (Pfeil); **E**, Anaphase I, Chromosomen werden ungleichmäßig auf die beiden Tochterkerne aufgeteilt, einige Chromosomen

werden nicht in den Segregationsprozess miteinbezogen, vereinzelt sind Chromosomenbruchstücke zu finden; **F**, Telophase I, die Dekondensation der Chromosomen lässt im hier gezeigten Beispiel die ungleiche Segregation deutlich erkennen; **G**, Metaphase II, Chromosomen ordnen sich in den Äquatorialebenen an, sie sind ungleichmäßig auf die beiden Tochterkerne verteilt; **H**, Anaphase II, die unregelmäßige Segregation setzt sich während der Aufteilung der Chromatiden fort; **I**, Telophase II, Chromatiden dekondensieren, in Folge der ungleichen Chromosomen- und Chromatiden-Segregation entstehen Polyaden mit Zellen variabler Form und Größe. *Balken: 10 μm*

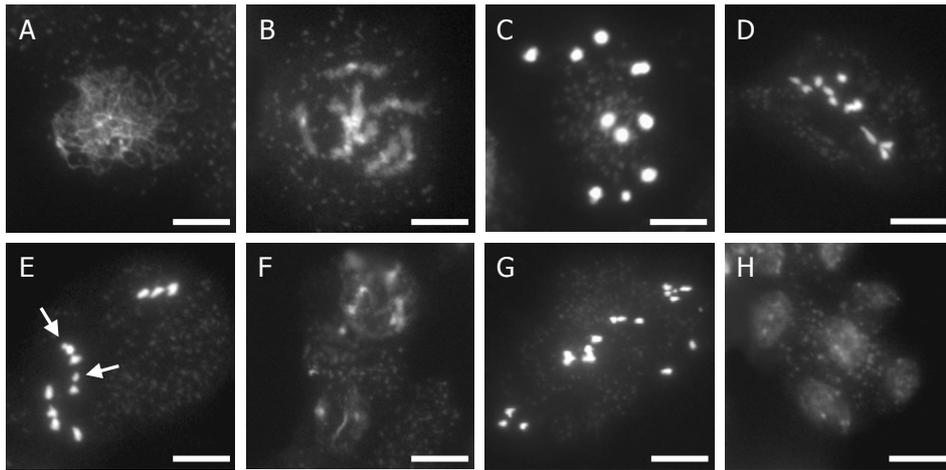


Abb. 29: Meiose in Meiozyten der *top3α/spo11-2*-Doppelmutante. Der *top3α*-Phänotyp kann durch eine zusätzliche SPO11-2-Mutation weitgehend aufgehoben werden **A**, Zygotän/Pachytän; **B**, Diplotän, es werden Univalente statt Bivalente gebildet; **C**, Diakinese, Univalente kondensieren weiter; **D**, Metaphase I, es findet keine Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene statt; **E**, Anaphase I, neben der unregelmäßigen Aufteilung der Chromosomen sind vereinzelt Chromosomenfragmente zu finden (Pfeile); **F**, Telophase I, Dekondensation der Chromosomen, die ungleiche Verteilung der Chromosomen ist deutlich zu erkennen; **G**, Anaphase II, die unregelmäßige Segregation setzt sich während der Aufteilung der Chromatiden fort; **H**, Telophase II, Chromatiden dekondensieren, es entstehen Polyaden mit veränderlicher Anzahl, Form und Größe der Zellen. *Balken: 10 μm*

Teilung. Anders als bei *top3α* findet bei der Doppelmutanten auch die zweite Teilung statt (Abb. 29 G, H). Sie endet mit der Bildung von Polyaden, die eine der *spo11-2*-Mutante vergleichbare Anzahl an Tochterkernen enthält. Wie bereits bei *spo11-2/rad51* beobachtet wurde, konnte auch bei *top3α/spo11-2* in wenigen Fällen die Bildung von Chromosomenfragmenten nachgewiesen werden. So können z.B. in Abbildung 29 E mehr als zehn Chromosomensignale gezählt werden. Während der meiotischen Rekombination erfüllt TOP3α demnach seine Aufgabe erst dann, wenn Strangbrüche bereits durch SPO11-2 induziert wurden.

Vergleicht man die Abbildungen 26 A-H und 30 A-H so kann man feststellen, dass chromosomale Aberrationen der *top3α/rad51*-Doppelmutante mit denen der *rad51*-Mutante übereinstimmen. Wie bei *rad51* ist die Synapsis homologer Chromosomen während der Prophase aufgehoben (Abb. 30 B), dagegen ist die *top3α*-Mutante in der Lage Bivalente zu bilden. Gravierende Fragmentierungen treten bei der Doppelmutante bereits während des Diplotäns (Abb. 30 B) in Erscheinung. Zwar können auch bei *top3α* während dieses Stadiums Störungen beobachtet werden, diese sind jedoch weniger schwerwiegend als bei *rad51*. Anders als *top3α*

durchläuft *top3α/rad51* trotz massiver Zerstörung der Chromosomen die zweite meiotische Teilung (Abb. 30 F-H), ein Charakteristikum der *rad51*-Mutante. Aus der zweiten Teilung gehen Polyaden mit einer variablen Anzahl an Tochterkernen hervor, die phänotypisch ebenfalls der *rad51*-Mutation entsprechen (Abb. 30 H). Innerhalb meiotischer Rekombinationsprozesse erfüllt RAD51 demzufolge eine TOP3α vorgeschaltete Funktion.

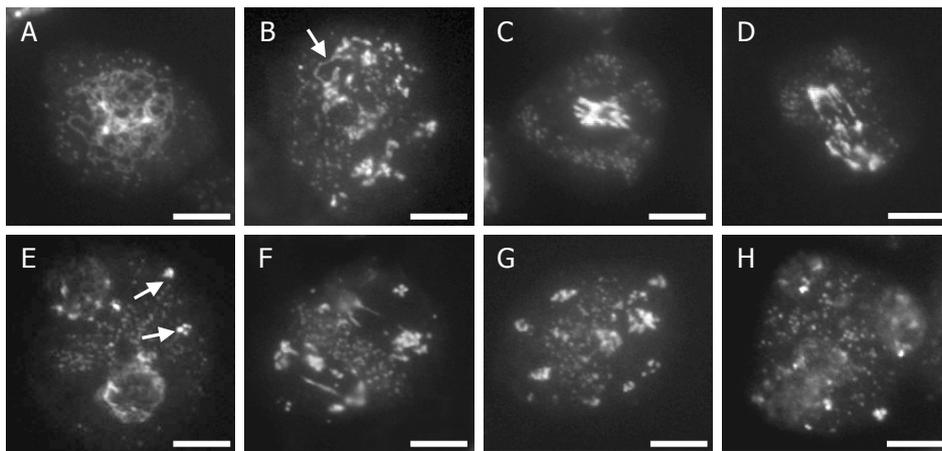


Abb. 30: Meiose in Meiozyten der *top3α/rad51*-Doppelmutante. **A**, Zygotän/Pachytän; **B**, Diplotän, bereits jetzt sind Fragmentierungen und Brückenbildungen zwischen Chromosomen zu erkennen (Pfeil); **C**, Metaphase I, Chromosomen ordnen sich völlig unstrukturiert in der Äquatorialebene an; **D**, Anaphase I, während der Chromosomen-segregation entstehen Chromosomenbrüche und –brücken; **E**, Telophase I, Chromosomen dekondensieren, oft liegen Chromosomen oder Fragmente vereinzelt in der Zelle vor (Pfeile); **F**, **G**, Anaphase II, Fragmentierungen und Brückenbildungen sind deutlich zu erkennen, (F) frühere Anaphase II, (G) fortgeschrittenes Stadium; **H**, Telophase II, die Dekondensation der Chromatiden lässt ihre unregelmäßige Verteilung erkennen; Chromosomenfragmente sind zwischen den Tochterkernen verstreut. *Balken: 10 μm*

3.3.5 Die Mutation von TOP3α führt zu Chromosomenfragmentierungen während der Mitose

Die meisten sterilen Mutanten zeigen während des vegetativen Wachstums keine wesentlichen phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp. Oft ist eine vermehrte Infloreszenz-Bildung zu beobachten (Abb. 12 A), da die Pflanze versucht, die Sterilität zu kompensieren. Im Gegensatz dazu sind bei *top3α* bereits während der vegetativen Wachstumsphase morphologische Fehlbildungen zu erkennen, die sich z.B. durch die Verwachsung von Infloreszenzen zeigen

(Frank Hartung persönliche Kommunikation). Auch während der Blütenbildung konnten, wie in Abbildung 17 zu sehen ist, Abweichungen vom Wildtyp beobachtet werden. Um diese Fehlbildungen näher zu charakterisieren wurden mitotische Zellen Fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Während der Mikroskopie von Meiozyten ist eine Vielzahl somatischer Zellen aus den umgebenden Geweben vorhanden, die aufgrund des starken Wachstums der Blütenorgane einige Mitosezellen enthalten. Daher wurden, Blütenknospen unterschiedlicher Entwicklungsstadien fixiert und die Staubblätter isoliert. Die Zellen der Antheren wurden durch leichten Druck aufs Deckglas vereinzelt und Chromosomen mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Mitotische Zellen vom Stadium der frühen Anaphase bis zur frühen Telophase wurden ausgezählt und der Anteil fehlerhafter Mitosen ermittelt. Als defekt galt eine Mitose, wenn Chromosomenbrücken zwischen den Tochterzellen auftraten oder Chromosomenbruchstücke, die keinem der beiden Pole zugeordnet werden konnten, vorhanden waren (Abb. 31 D, F, G, H, J, K, L, N, O, P). Die Abbildungen 31 A, B, C, E, I und M zeigen zum Vergleich normal ablaufende Mitosen.

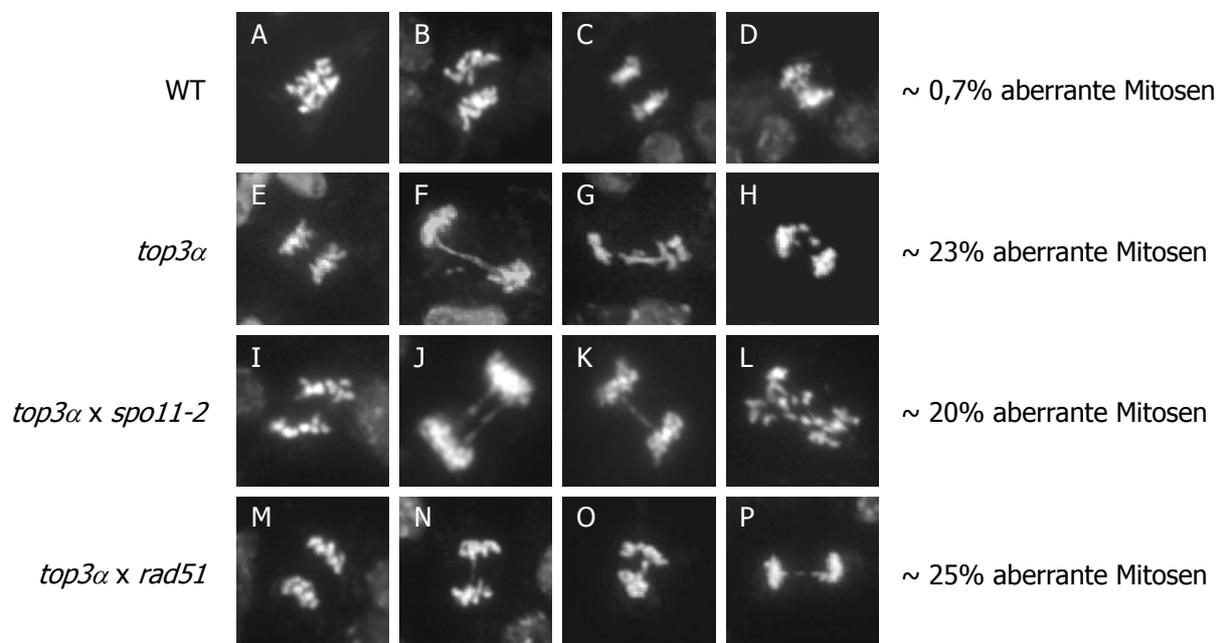


Abb. 31: Mitosen von *top3α*, *top3α/spo11-2* und *top3α/rad51* im Vergleich zu *A. thaliana*-Col-0. Beim Wildtyp wurden 0,7% defekte Mitosen gezählt, bei *top3α* ~23%. Ein zusätzliches Ausschalten von SPO11-2 oder RAD51 führt zu keiner signifikanten Änderung des Anteils fehlerhafter Mitosen.

Für Blütenknospen des Wildtyps wurden 0,7% fehlerhafter Mitosen ermittelt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es durch Präparationsprozesse zur Zerstörung einzelner Zellen kommt, die möglicherweise als fehlerhaft gewertet werden. Dies würde den relativ hohen Gehalt defekter Mitosen in Wildtyp-Zellen erklären. Da der gleiche Fehler jedoch auch bei den zu untersuchenden Mutanten auftritt, sind die Werte vergleichbar. Mitotische Zellen der *top3α*-Mutante waren zu ~23% defekt. Auch Doppelmutanten, die eine ausgeschaltete TOP3α-Funktion enthalten, zeigen einen ähnlich hohen Wert fehlerhafter Mitosen. So wurde für die *top3α/spo11-2*-Mutante ein Wert von 20% und für die *top3α/rad51*-Mutante von 25% defekter Mitosen ermittelt. Der hohe Gehalt chromosomaler Aberrationen während der Mitose zeigt, dass TOP3α in *Arabidopsis* nicht nur während der Meiose, sondern auch in somatischen Zellen eine wichtige Funktion zukommt.

4 DISKUSSION

Die meiotische Rekombination nimmt nicht nur während der Entwicklung eines Individuums einen besonderen Stellenwert ein, sondern ist auch aus evolutionsbiologischer Sicht von grundlegender Bedeutung. So können Störungen, die während der meiotischen Entwicklungsphase eines Organismus auftreten zu eingeschränkter Fertilität, zur Sterilität oder zu Fehlbildungen bzw. Letalität dessen Nachkommen führen. Meiotische Rekombinationsvorgänge zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen ermöglichen die Unterbrechung von Kopplungsgruppen, die zur Eliminierung nachteiliger Eigenschaften oder Mutationen führen können. Je größer der Abstand zweier Gene auf einem Chromosom ist, umso wahrscheinlicher ist, dass ein Crossover zwischen ihnen stattfindet. Durch meiotische Rekombination entstehen unzählige Kombinationsmöglichkeiten der elterlichen Chromosomensätze, was die Grundlage biologischer Vielfalt schafft.

Die homologe Rekombination stellt einen wichtigen Abschnitt der Meiose dar; ihr fehlerfreier Ablauf ist für eine normale Entwicklung der Gameten essentiell. Aus Rekombinationsprodukten gehen Chiasmata hervor, die Homologe bis zur ersten Metaphase zusammenhalten und eine gleichförmige Segregation der Chromosomen gewährleisten. Kommt es während dieses Prozesses zu Störungen, so kann dies schwerwiegende Folgen haben, die beim Menschen zu Fehlgeburten, Geburtsfehlern oder Unfruchtbarkeit der Nachkommen führt (siehe Reviews Page und Hawley, 2003; Engel et al., 2004). Es ist daher nicht verwunderlich, dass die homologe Rekombination durch eine Vielzahl an Faktoren gesteuert und reguliert wird.

Die vorliegende Arbeit stellte einige dieser Faktoren vor und charakterisierte deren Einfluss auf den Ablauf der meiotischen Rekombination. Dazu gehören SPO11-1, SPO11-2 und TOP3 α , die ausschließlich cytologisch und cytogenetisch untersucht wurden, und BRCA2, dessen Mutanten zusätzlich durch Beobachtung phänotypischer Eigenschaften unter normalen Wachstumsbedingungen und genotoxischem Stress beschrieben werden sollten. Ergebnisse, die aus der Kultivierung von *brca2*-Mutanten unter verschiedenen Bedingungen gewonnen wurden, sollen der Diskussion vorangestellt werden. So können Resultate aus cytologischen Untersuchungen der einzelnen Rekombinationsfaktoren anschließend im Zusammenhang betrachtet und diskutiert werden.

4.1 DIE *brca2(IV)/brca2(V)*-DOPPELMUTANTE

Arabidopsis thaliana besitzt zwei Kopien des *BRC A2*-Gens, die auf Chromosom IV und V lokalisiert sind und deren Genprodukte eine Identität von 94,5% auf Proteinebene aufweisen (Siaud et al., 2004). Aus den Einzelmutanten *brca2(IV)* (GABI_290C01) und *brca2(V)* (SALK_037617) wurde eine Doppelmutante hergestellt, die zur Untersuchung somatischer und meiotischer Eigenschaften von *BRCA2* verwendet wurde. Eine Expressionsanalyse hat gezeigt, dass die *brca2(IV)/brca2(V)*-Doppelmutante kein vollständiges *BRCA2*-Transkript exprimieren kann. Zwar entstehen im N- und im C-Terminus kurze *BRCA2*-Fragmente, diese scheinen jedoch keine *BRCA2*-typische Funktion zu erfüllen. Diese Vermutung geht vor allem auf die völlige Sterilität der *brca2(IV)/brca2(V)*-Mutante zurück, die durch Entwicklungsstörungen der Meiozyten bedingt ist. Es kann somit angenommen werden, dass es sich bei der *brca2(IV)/brca2(V)*-Doppelmutante um eine *brca2*-Nullmutante handelt. Dies steht im Gegensatz zur *BRC A2*-RNAi-Mutante von Siaud et al. (2004). Mit dieser Mutante wurde die Fertilität der Transformanten zwar weitgehend aufgehoben, zwei von 20 Pflanzen zeigten jedoch keine Einschränkung der Fruchtbarkeit, bei den weiteren Pflanzen war die Fertilität vermindert. Beim RNAi-vermittelten Gen-Silencing kommt es oft nur zur Reduktion einer Proteinfunktion und nicht zu deren Ausschaltung, was die Rest-Fertilität der Mutante erklären könnte. Um festzustellen ob *brca2(IV)/(V)* männlich oder weiblich steril ist, oder ob beide Reproduktionsorgane betroffen sind, wurde eine reziproke Rückkreuzung mit dem Wildtyp durchgeführt. Wurde die *brca2(IV)/(V)*-Mutante als Vaterpflanze verwendet, haben sich keine Nachkommen entwickelt. Wurde die Doppelmutante jedoch mit Wildtyp-Blütenpollen bestäubt, so entstanden Schoten, die in wenigen Fällen ein oder zwei Samen enthielten. Interessanterweise haben Panoli et al. (2006) mit einer sterilen *mnd1*-Mutante ähnliche Ergebnisse erzielt. Mit der *mnd1*-Mutante als Vaterpflanze entwickelten sich keine Samen, während *mnd1* mit WT-Blütenpollen bestäubt in einigen Fällen ein bis zwei Samen hervorbrachte. Li et al. (2007) konnten mit einer *rad51*-Doppelmutante von Mais eine komplette männliche Sterilität nachweisen, dagegen erbrachte die Kreuzung der Doppelmutante mit Wildtyp-Pollen ~22% der Wildtyp-Menge an Samen. Mit der *spo11-1-1*-T-DNA-Insertionsline zeigten Grelon et al. (2001), dass die Bestäubung homozygoter Mutanten mit Blütenpollen des Wildtyps im Durchschnitt 3,2 Samen pro Schote hervorbrachte. Weibliche Gametophyten scheinen demnach toleranter gegenüber meiotischen Defekten zu sein als männliche. Vergleicht man die geringe Anzahl an

Samenanlagen in *Arabidopsis*-Fruchtknoten (± 45) mit der relativ großen Menge an Blütenpollen, die eine Blüte insgesamt produziert, so kann man vermuten, dass diese Toleranz der weiblichen Gameten dazu dient, möglichst die Produktion an Nachkommen zu sichern. Eine weitere, und möglicherweise auch biologisch relevantere Überlegung ist, dass die Toleranz weiblicher Gameten auf die Verfügbarkeit von Ressourcen zurückgeführt werden kann. Ein Blütenpollen muss sich nach der Freisetzung aus der Anthere über seinen eigenen Stoffwechsel versorgen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass bei schweren chromosomalen Störungen diese Selbstversorgung nicht gewährleistet werden kann. Dagegen ist die Eizelle zu jeder Zeit durch die Gewebe der Samenanlage umgeben, die zu einer Versorgung der Eizelle beitragen könnten. Die Untersuchung von Samenanlagen mittels DIC-Mikroskopie bestätigte eindeutig, dass trotz gewisser Toleranzen weiblicher Gameten der *brca2(IV)/(V)*-Mutante gegenüber BRCA2-Defekten eine gravierende Beeinträchtigung der Embryosackentwicklung besteht (Abb. 20, Seite 66). Antheren von *brca2(IV)/(V)* entwickelten nach Ablauf der beiden meiotischen Teilungen keine Tetraden, sondern Polyaden mit einer sehr unterschiedlichen Anzahl an Zellen mit variabler Form und Größe. Die Sterilität der *brca2(IV)/(V)*-Mutante ist demnach eindeutig auf Defekte während der Entwicklung männlicher und weiblicher Gametophyten zurückzuführen. Damit kann BRCA2 eine essentielle Funktion während der Gametenbildung zugeschrieben werden.

Es sollte nun festgestellt werden, ob BRCA2 auch während des somatischen Wachstums von *A. thaliana* eine Rolle spielt. Während der vegetativen Entwicklungsphase konnten bei *brca2(IV)/(V)* unter normalen Entwicklungsbedingungen (23-24°C, 16h Tag, 8h Nacht) keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp beobachtet werden. Die Behandlung von *brca2(IV)/(V)*-Keimlingen mit Bleomycin erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Auch die *brca2(IV)*- und *brca2(V)*-Einzelmutanten zeigten keine vom Wildtyp abweichende Reaktion auf die Behandlung mit Bleomycin. Wurde jedoch Mitomycin C als mutagenes Agens verwendet, so konnte bei *brca2(IV)/(V)*-Keimlingen eine gesteigerte Sensitivität im Vergleich zu *Arabidopsis*-Col-0 beobachtet werden. Die Sensitivität dieser Mutante äußerte sich durch ein vermindertes Wachstum der Keimlinge, durch eine geringere Anzahl an Rosettenblättern und der Verringerung des Frischgewichtes. Weshalb reagieren *brca2(IV)/(V)*-Keimlinge derart unterschiedlich auf die Behandlung mit Bleomycin und Mitomycin C? Bleomycin ist ein Mutagen, das die Wirkung ionisierender Strahlung nachahmt und unabhängig vom Stadium des Zellzyklus Einzel- und Doppelstrangbrüche verursacht. Bei Pflanzen werden während der G₀ und der G₁-Phase des Zellzyklus Doppelstrangbrüche hauptsächlich durch Nonhomologous End-joining

(NHEJ) repariert und nur ein sehr geringer Anteil durch homologe Rekombination (Puchta und Hohn, 1996; Gorbunova und Levy, 1997; Puchta, 1999a; Siebert und Puchta, 2002). Wird die homologe Rekombination blockiert, so wird die Reparatur von DSBs verstärkt in Richtung NHEJ gelenkt (Moynahan et al., 1999). BRCA2 scheint ausschließlich an der Reparatur von Strangbrüchen durch homologe Rekombination beteiligt zu sein, da bisher keine Daten vorhanden sind, die auf eine Rolle des Proteins bei anderen Reparaturwegen, z.B. des NHEJ, hinweisen. Zwar kommt BRCA2 in mammalischen Systemen auch eine Beteiligung am Fanconi-Anemia-Reparaturweg zu, doch dieser Weg der Schadenserkennung mündet wahrscheinlich ebenfalls in der Reparatur durch HR (Hussain et al., 2004; Nakanishi et al., 2005; Kitao et al., 2006; Takata et al., 2006). Auch die Einwirkung von Mitomycin C (MMC) führt zur Entstehung von Doppelstrangbrüchen, die jedoch nicht direkt gebildet werden. Die Wirkung von MMC beruht auf der Bildung alkylierter DNA-Addukte, Guanin-MMC-Guanin-Interstrang-Crosslinks und Intrastrang-Crosslinks an CpG bzw. GpG-Positionen (Warren et al., 2001; Palom et al., 2002; Zheng et al., 2003). Diese DNA-Crosslinks verhindern während der Replikation von DNA-Strängen das Fortschreiten der Replikationsgabel. Infolgedessen entstehen Einzel- und Doppelstrangbrüche während der S-Phase des Zellzyklus (Sognier und Hittelman, 1986; Mladenov et al., 2007). Die Reparatur von DSBs erfolgt während der späten S-Phase durch den Mechanismus der homologen Rekombination, da das Schwesterchromatid als Matrize verwendet werden kann (Takata et al., 1998; Sonoda et al., 1999). Dies erklärt die erhöhte Sensitivität der *brca2(IV)/(V)*-Mutante auf Behandlung mit MMC. Interessanterweise zeigten auch einige Keimlinge der *brca2(IV)*-Mutante eine deutliche MMC-Sensitivität. Die Aufspaltung in sensitive und nicht-sensitive Keimlinge folgte jedoch keinen Segregationsregeln und war von einem Ansatz zum anderen sehr unterschiedlich. Es wurde daher angenommen, dass dieser Effekt auf Gen-Silencing beruht. Durch die Bestimmung der *BRCA2*-Transkriptmenge der sensitiven Keimlinge im Vergleich zu normal wachsenden und Col-0-Keimlingen konnte diese Annahme bestätigt werden. Sensitive *brca2(IV)*-Keimlinge konnten demnach entweder weniger oder kein funktionsfähiges BRCA2-Protein exprimieren und verhielten sich darauf hin wie die doppelt-homozygote *brca2(IV)/(V)*-Mutante. Dies ist eine indirekte Bestätigung der Ergebnisse zur Bestimmung der MMC-Sensitivität der *brca2(IV)/(V)*-Mutante.

Die Untersuchungen zeigen eindeutig, dass das Ausschalten beider *BRCA2*-Gene zu einer erhöhten Sensitivität der Pflanzen gegen das Crosslinks-verursachende Mutagen Mitomycin C führt. Damit scheint BRCA2 nicht nur eine wesentliche Rolle während der Entwicklung der

Gametophyten zu spielen, sondern auch auf somatischer Ebene wichtige Funktionen während der Reparatur von DNA-Schäden zu übernehmen. Rekombinations-Assays mit *brca2*-Mutanten, die ein Reporterkonstrukt für homologe Rekombinationsereignisse enthalten, sollen in Zukunft weitere Erkenntnisse über die Funktion von BRCA2 während der Reparatur von DNA-Schäden in somatischen Zellen liefern.

4.2 DAS AUSSCHALTEN VON REKOMBINATIONSFAKTOREN FÜHRT ZU FEHLENTWICKLUNGEN DER GAMETOPHYTEN

Entwicklungsstörungen von Gametophyten, die durch das Ausschalten bestimmter Rekombinationsfaktoren entstehen, wurden nicht nur an *brca2(IV)/(V)*, sondern auch an *spo11-1*, *spo11-2*, der *spo11-1/spo11-2*-Doppelmutante und *top3 α* untersucht. Bereits während der Blütenbildung kann beobachtet werden, dass es bei diesen Mutanten zu Störungen während der Entwicklung der Staubblätter kommt. Die Stamina wirken verkürzt im Vergleich zum Wildtyp und besitzen frühzeitig degenerierende Antheren. Diese Entwicklungsstörung führt zur Sterilität aller hier untersuchten Mutanten, wobei *brca2(IV)/(V)* und *top3 α* völlig steril sind, während die *spo11*-Mutanten eine geringe Menge an Samen produzieren können (Hartung et al., 2007a; Frank Hartung, persönliche Kommunikation).

Die mikroskopische Analyse der Antheren ergab, dass alle Mutanten anstelle der im Wildtyp zu findenden Tetraden Polyaden mit einer sehr variablen Anzahl an Zellen produzierten. In *spo11*-Mutanten und in *brca2(IV)/(V)* enthielten die Polyaden meist mehr als vier Zellen, die sich bezüglich ihrer Form und Größe sehr unterschieden. Bei *top3 α* sind in den meisten Fällen Diaden und Triaden zu finden. Beim Wildtyp wird jede Zelle der Tetrade freigesetzt und entwickelt sich zu Mikrosporen weiter, die zu Blütenpollen heranreifen (Regan und Moffatt, 1990; Horvitz und Herskowitz, 1992; McCormick, 1993; Bird et al., 1983). Die Mutanten *spo11-1*, *spo11-2* und *spo11-1/spo11-2* enthalten zwar zahlreiche Mikrosporen, deren Aussehen jedoch sehr variiert. Auch in *top3 α* sind derart unterschiedliche Mikrosporen zu finden, allerdings ist deren Anzahl im Vergleich zum Wildtyp eher gering und auf die Bildung von Diaden und Triaden zurückzuführen (Abb. 18, Seite 63).

Als wichtige Kontroll-Linie diente bei den hier durchgeführten Experimenten die *rad51*-Mutante, die durch Li et al. (2004) beschrieben wurde. Li et al. (2004) wiesen die Polyaden-Bildung in *rad51* durch Toluidinblau-Färbung von Chromatinbereichen isolierter Meiozyten der Mutante und des Wildtyps nach. Die Degeneration reifender Mikrosporen wurde durch Alexander-Färbung der Antheren von *rad51* und Wildtyp-Pflanzen gezeigt. Durch diese Methode wird das Cytoplasma der Blütenpollen gefärbt, was die Ermittlung des Degenerationsgrades der Zellen ermöglicht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beruhen auf der Untersuchung von Antheren mittels DIC-Mikroskopie. Trotz der unterschiedlichen Techniken, die den Resultaten von Li et al. (2004) und den hier gewonnenen Daten zugrunde liegen, konnten die gleichen Auswirkungen einer *rad51*-Mutation auf die Entwicklung von Antheren festgestellt werden. Auffällig ist, dass die Ergebnisse der *brca2(IV)/(V)*-Mutante und die der *rad51*-Mutante bezüglich der Antherenentwicklung vergleichbar, wenn nicht identisch, sind (Abb. 18 E1, E2, F1, F2, Seite 63). In beiden Fällen entwickeln sich aus den Polyaden zahlreiche Mikrosporen, die zwar eine relativ einheitliche Gestalt besitzen, doch deutlich kleiner sind als der Wildtyp und einen hohen Degenerationsgrad aufweisen. Ein Grund dieses ähnlichen Phänotyps könnte die enge Zusammenarbeit zwischen RAD51 und BRCA2 während der Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination sein (z.B. Katagiri et al., 1998; Chen et al., 1999; Davies et al., 2001; Moynahan et al., 2001; Kojic et al., 2002; Kowalczykowski, 2002; Pellegrini et al., 2002; Shin et al., 2003; Siaud et al., 2004; Martin et al., 2005; Shivji et al., 2006; Min et al., 2007). Durch die Analyse der meiotischen Entwicklung von Pollenmutterzellen (PMZ), die ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Arbeit war, soll gezeigt werden, ob auch auf zellulärer Ebene vergleichbare Eigenschaften zwischen *brca2(IV)/(V)* und *rad51* beobachtet werden und diese Annahme bekräftigt wird. Dieser Aspekt soll an späterer Stelle noch einmal aufgegriffen und diskutiert werden.

Es stellte sich nun die Frage, ob auch die weiblichen Gametophyten eine beeinträchtigte Entwicklung zeigen, was durch DIC-mikroskopische Analysen näher untersucht wurde. In Samenanlagen von *Arabidopsis*-Col-0 entsteht während der Reifung des Embryosackes eine charakteristische Abfolge an Zellteilungen. Zunächst werden die beiden Teilungen der Meiose durchlaufen, aus denen eine Megaspore hervorgeht. Durch drei mitotische Teilungen entsteht aus der Megaspore ein achtkerniger Embryosack, der nach Durchlaufen einer Cytokinese eine befruchtungsfähige Eizelle hervorbringt (Abb. 19, Seite 65). Die Samenanlagen der hier untersuchten Mutanten sind weder zur Bildung normaler Meioseprodukte (Daten nicht gezeigt)

noch zur Entwicklung eines befruchtungsfähigen Embryosackes fähig (Abb. 20, Seite 66). Es entstehen Samenanlagen die z.T. einen kernlosen, degenerierten Embryosack enthalten oder deren Embryosack eine Zelle enthält, die während des Reifeprozesses bestehen bleibt. Damit konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten von SPO11-1, SPO11-2, BRCA2 oder TOP3 α auch bei weiblichen Gametophyten zu gravierenden Defekten während der Entwicklung führt.

4.3 DER EINFLUSS MUTIERTER SPO11-, BRCA2- UND TOP3 α -PROTEINE AUF DEN ABLAUF DER MEIOSE

Mutationen in SPO11-1, SPO11-2, BRCA2 und TOP3 α haben zu schweren Entwicklungsstörungen der Blütenpollen geführt. Durch Fluoreszenz-mikroskopische Analyse von Meiozyten der Mutanten sollte die Ursache dieser Defekte auf chromosomaler Ebene näher charakterisiert werden.

4.3.1 Die spo11-Mutanten

Es gilt heute als gesichert, dass die Funktion von SPO11 in Hefen und Tieren darin besteht, die Bildung von Doppelstrangbrüchen, die zu Beginn der meiotischen Rekombination entstehen, zu katalysieren (z.B. Keeney et al., 1997; Lichten, 2001; Storlazzi et al., 2003; Tessé et al., 2003). In Pflanzen wird diese Funktion von den beiden SPO11-Orthologen SPO11-1 und SPO11-2 übernommen (Grelon et al., 2001; Stacey et al., 2006). Grelon et al. (2001) haben zwei allelische Punktmutationslinien und eine T-DNA-Insertionslinie im *A. thaliana*-Wassilewskija-Hintergrund verwendet um den meiotischen Phänotyp von *spo11-1*-Mutanten zu untersuchen. Die gleichen Untersuchungen wurden hier an einer T-DNA-Insertionslinie von SPO11-1 im *A. thaliana*-Col-0-Hintergrund durchgeführt. Die hier gewonnenen Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit den von Grelon et al. (2001) publizierten Daten überein.

Meiozyten der *spo11-1*-Mutante wurden mit DAPI-Lösung gefärbt und anschließend Fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Die Analyse meiotischer Stadien hat gezeigt, dass die Bivalentbildung in *spo11-1* weitgehend aufgehoben war, was vor allem in Prophase-Stadien mit

fortgeschrittener Chromosomenkondensation deutlich zu erkennen ist. In frühen Stadien der Prophase wurde keine Chromosomenstruktur gefunden, die den Pachytän-Chromosomen des Wildtyps entsprechen. Aufgrund der fehlenden Bivalentbildung können daher Pachytän-Stadien nicht oder kaum von Zygotän-Stadien unterschieden werden. Während des Diplotäns und der Diakinese waren bis zu zehn Chromosomensignale zu finden, die einzelnen, ungepaarten Chromosomen entsprechen. Wäre die Bivalentbildung vollständig aufgehoben, so sollten in allen Zellen zehn Chromosomensignale zu sehen sein, was jedoch nicht der Fall ist. Eine ähnliche Beobachtung haben auch Grelon et al. (2001) gemacht. Sie konnten in wenigen Fällen die Bildung von Chromosomenbrücken nachweisen und vermuteten, dass einige Chromosomen trotz SPO11-1-Mutation in der Lage sind Bivalente zu bilden. Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen konnten in seltenen Fällen Chromosomenbrücken nachgewiesen werden. In Verbindung mit der Tatsache, dass nicht immer zehn Univalente pro Zelle zu finden sind, scheint auch die *spo11-1-3*-Mutante vereinzelt Bivalente zu bilden. Es kann jedoch auch zu Überlagerungen von Chromosomensignalen kommen oder einige Signale liegen aufgrund der räumlichen Struktur der Zelle in einer anderen Ebene und sind somit nicht sichtbar. Die Untersuchung von Meiozyten mittels konfokaler Mikroskopie könnte diesbezüglich aufschlussreiche Ergebnisse liefern. Eine statistische Auswertung des Anteils an Zellen mit weniger als zehn Univalenten würde mit der hier verwendeten Methode der DAPI-Färbung und Fluoreszenz-Mikroskopie keine verlässlichen Werte liefern. Weiterhin ist zu bedenken, dass mit dieser Methode nicht überprüft werden kann, ob es im Fall einer Bivalentbildung tatsächlich Homologe sind, die eine Paarung eingehen, oder ob ein Zusammenschluss heterologer Chromosomen stattfindet. Sollten tatsächlich Bivalente auftreten, so wäre es auch möglich, dass es sich bei den untersuchten *spo11-1*-Mutanten nicht um Nullmutanten handelt und somit eine Restaktivität von SPO11-1 besteht.

Ursache der fehlenden Bivalentbildung ist vermutlich das Ausbleiben von Rekombinationsprozessen, die zur Bildung von Rekombinationsknoten führen und wichtig für die anfänglichen Schritte der Chromosomenpaarung und die Stabilisierung von Bivalenten sind (Schwacha und Kleckner, 1994). Auch Mutanten anderer Rekombinationsfaktoren, wie RAD51 (Li et al., 2004 und vorliegende Arbeit), BRCA2 (Siaud et al., 2004 und vorliegende Arbeit) oder RAD51C (Abe et al., 2005b), sind durch fehlende Bivalentbildung und Rekombinationsereignisse gekennzeichnet. Im Vergleich zu diesen Mutanten kann in *spo11-1* jedoch keine Chromosomenfragmentierung beobachtet werden. Fragmentierungen entstehen, wenn Strangbrüche in die

DNA eingebracht werden, die darauf folgenden Rekombinationsschritte aufgrund des Fehlens eines essentiellen Faktors jedoch nicht durchgeführt werden können (z.B. Li et al., 2004; Siaud et al., 2004; Abe et al., 2005 und vorliegende Arbeit). Daher kann die Abwesenheit von Chromosomenfragmentierungen in *spo11-1-3* darauf zurückgeführt werden, dass keine DSBs gebildet werden. Dies zeigt noch einmal deutlich, dass SPO11-1 eine Beteiligung bei der Bildung von Doppelstrangbrüchen während der Meiose zukommt.

Trotz massiver Störung der Bivalentbildung durchläuft die Zelle beide meiotische Teilungen. Während der ersten Metaphase kann beobachtet werden, dass keine eindeutige Ausrichtung der Univalente innerhalb der Äquatorialebene erfolgt (Abb. 22 D, Seite 70). Möglicherweise kommt es aufgrund der fehlenden Bivalentbildung zu Störungen während der Anlagerung von Kinetochorproteinen, was Voraussetzung für die Anheftung von Mikrotubuli an die Centromerbereiche ist. Dies könnte auch eine Erklärung für die völlig ungerichtete und ungleichmäßige Segregation der Univalente während der ersten meiotischen Teilung sein (Abb. 22 E, Seite 70). Während der zweiten Teilung, die der Trennung der Schwesterchromatiden dient, wird die ungleichförmige Segregation aus der ersten Teilung fortgesetzt. Die Aufteilung der Schwesterchromatiden erfolgt dabei zwar ungerichtet, jedoch meist symmetrisch. Das Resultat dieser Teilungen ist die Bildung von Polyaden statt Tetraden mit meist mehr als vier Zellen (Abb. 22 I, Seite 70), die einen aberranten Chromosomensatz enthalten. Dabei entstehen zum Teil Chromosomensätze, die die Weiterentwicklung der Mikrosporen zu reifen Blütenpollen ermöglichen. Es wäre daher interessant den DNA-Gehalt der Nachkommen der *spo11-1*-Mutante zu untersuchen. Dies würde auch Aufschluss darüber geben, ob die Samenproduktion der Mutante auf Selbstbefruchtung mit Blütenpollen, die einen abweichenden Chromosomensatz enthalten, zurückzuführen ist oder ob eine Restaktivität von SPO11-1 besteht. Für die hier untersuchte *spo11-2-3*-Mutante wurde diese Analyse durchgeführt und untersucht, ob die ungleiche Segregation zur Aneuploidie der Nachkommen führte. Mittels Flow-Cytometrie konnte gezeigt werden, dass die meisten Keimlinge, die aus diesen Samen gezogen wurden, einen erhöhten DNA-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Hartung et al., 2007a), was die aufgestellte Vermutung stützt, dass je nach Aberration des Chromosomensatzes lebensfähige Gameten entstehen können. Somit können Keimzellen aufeinander treffen, deren Chromosomensätze die Entwicklung eines Keimlings zulassen. Oft zeigen diese Keimlinge jedoch deutliche Entwicklungsstörungen (Hartung et al., 2007a).

Da angenommen wurde, dass es sich bei SPO11-1 um das funktionelle Homologe eukaryontischer SPO11-Proteine handelt (Grelon et al., 2001), stellte sich die Frage welche Funktion den andern beiden SPO11-Orthologen in Pflanzen zukommt. Es konnte gezeigt werden, dass SPO11-3 zusammen mit AtTOP6B als funktionelle TOP6AB-Topoisomerase eine wichtige Rolle während der Entwicklung von Sporophyten spielt (Hartung und Puchta, 2001; Hartung et al., 2002; Yin et al., 2002; Corbett und Berger, 2003), da sie an den Mechanismen der DNA-Replikation und Endoreplikation beteiligt ist (Hartung et al., 2002). Eine Funktion von SPO11-3 bei meiotischen Prozessen wurde bisher nicht gezeigt. Interessanterweise konnte jedoch nachgewiesen werden, dass SPO11-2, wie SPO11-1, eine essentielle Aufgabe während der Entwicklung männlicher und weiblicher Gametophyten zukommt. Durch Untersuchungen von Meiozyten aus *spo11-2*-Antheren konnte gezeigt werden, dass SPO11-2 ein wesentlicher Faktor während der Meiose darstellt (Stacey et al., 2006). Für diese Untersuchungen arbeiteten Stacey et al. (2006) mit zwei *spo11-2*-Transposonmutanten. Um vergleichbare Daten zu erhalten wurde daher, wie für SPO11-1, eine T-DNA-Insertionslinie für mikroskopische Analysen verwendet. Die hier erzielten Daten stimmen mit den Ergebnissen von Stacey et al. (2006) überein. Interessant ist auch, dass Meiozyten der *spo11-2*-Mutante die gleichen Veränderungen der Chromosomenstruktur, die bereits für *spo11-1* beschrieben wurden, zeigten. Auf eine genauere Betrachtung der meiotischen Stadien soll daher verzichtet werden. Es ist jedoch bemerkenswert, dass chromosomale Aberrationen, die durch das Ausschalten von SPO11-1 oder SPO11-2 entstehen nahezu, wenn nicht vollständig, identisch sind. Die Ähnlichkeit der Phänotypen könnte dafür sprechen, dass die beiden SPO11-Proteine während der Bildung von Doppelstrangbrüchen zusammenarbeiten, sei es als Komplex oder durch hintereinander geschaltete Funktionen, die direkt voneinander abhängig sind. In dieser Arbeit sollte nun die Frage geklärt werden, ob den beiden Proteinen ausschließlich eine überlappende Funktion zukommt, oder ob auch ergänzende Aufgaben erfüllt werden. Da während der meiotischen Rekombination unterschiedliche Arten von Rekombinationsintermediaten entstehen – z.B. Crossover, Noncrossover, die über die Bildung von dHJ entstehen, oder Noncrossover, die über den Mechanismus des SDSA gebildet werden (Allers und Lichten, 2001a; 2001b; Hunter und Kleckner, 2001; Higgins et al., 2004; Jessop et al., 2005) – wäre es auch denkbar, dass einige Rekombinationsprodukte aus der Zusammenarbeit von SPO11-1 und SPO11-2 entstehen, andere hingegen nur von dem einen oder dem anderen Faktor abhängig sind. In beiden Fällen wäre die Bildung weniger Bivalente möglich. Ob den beiden Proteinen eine ergänzende Funktion zukommt sollte durch Herstellung

einer *spo11-1/spo11-2*-Doppelmutante gezeigt werden. Wie in Abbildung 24 (Seite 71) zu sehen ist, entspricht das Verhalten der Chromosomen während der männlichen Meiose bei *spo11-1/spo11-2* dem der *spo11-1*- und *spo11-2*-Einzelmutante. Es wurde bereits erwähnt, dass *spo11*-Mutanten eine geringe Menge an Samen produzieren. Diese lag bei *spo11-1-3* bei 0,5-1% und bei *spo11-2-3* bei 5-10% Samen pro Pflanze im Vergleich zum Wildtyp (Hartung et al., 2007a). Sollten SPO11-1 und SPO11-2 tatsächlich additive Funktionen zukommen, so wäre zu erwarten, dass die Doppelmutante keine Samen mehr produzieren kann. Tatsächlich war die Doppelmutante jedoch in der Lage wenige Nachkommen zu produzieren, wobei die Rest-Fertilität nie geringer war als die der *spo11-1*-Mutante. Damit hatte die Ausschaltung beider SPO11-Proteine keinen synergistischen Effekt zur Folge, was bedeutet, dass die beiden Proteine scheinbar keine sich ergänzenden Funktionen erfüllen.

4.3.2 Die *brca2(IV)/(V)*-Mutante

Meiozyten der *brca2(IV)/(V)*-Mutante zeigen einige Charakteristika, die bereits für *spo11*-Mutanten beschrieben wurden. So findet auch bei *brca2(IV)/(V)* keine Bivalentenbildung statt, was vor allem durch das Fehlen typischer Pachytän-Stadien deutlich wird. Dies führt auch bei *brca2(IV)/(V)* zur ungleichen Segregation der Chromosomen während der ersten meiotischen Teilung. Im Gegensatz zu *spo11*-Mutanten kann bei der *brca2(IV)/(V)*-Mutante eine zusätzliche Fragmentierung der Chromosomen beobachtet werden, die bereits während des Diplotäns und der Diakinese in Erscheinung treten (Abb. 25 B, C, Seite 72). Deutlich wird der Gehalt an Chromosomenfragmentierungen während der ersten und zweiten Anaphase, die zusätzlich durch Brückenbildungen zwischen Chromosomen oder Chromosomenbruchstücken begleitet sind. Diese schweren Aberrationen führen nach der zweiten Teilung zur Bildung von Polyaden, die neben einer variablen Anzahl an Zellen einen hohen Anteil an Chromosomenbruchstücken enthalten (Abb. 25 I, Seite 72). Damit konnten in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung einer *brca2(IV)/(V)*-Doppelmutante, die durch Kreuzung zweier T-DNA-Insertionslinien hergestellt wurde, die gleichen Ergebnisse erzielt werden, die Siaud et al. (2004) mittels *BRC42*-RNAi-Mutante erhielten.

BRCA2 ist ein wichtiger Mediator der homologen Rekombination, da es die Beladung von DNA-Einzelsträngen, die an DSB-Stellen entstehen, mit RAD51-Proteinen vermittelt (Yu et

al., 2003; Shivji et al., 2006; Davies und Pellegrini, 2007; Esashi et al., 2007; Min et al., 2007). Die Voraussetzung für die Bildung von RAD51-Nukleoproteinfilamenten und damit für die Einleitung der homologen Rekombination ist während der Meiose das Einbringen von DNA-Doppelstrangbrüchen durch SPO11-Proteine (z.B. Keeney et al., 1997; Grelon et al., 2001; Lichten, 2001; Stacey et al., 2006). In der *brca2(IV)/(V)*-Mutante kommen Rekombinationsprozesse bereits während der Homologie-Suche zum Erliegen. Da Chromosomenpaarung, Synapsis und Rekombination drei direkt voneinander abhängige Prozesse sind (z.B. Keeney et al., 1997; Baudat et al., 2000; Celerin et al., 2000; Romanienko und Camerini-Otero, 2000; Lichten, 2001; Storlazzi et al., 2003), erklärt dies die defekte Bivalentbildung in *brca2(IV)/(V)*. Die Wirkung der SPO11-Proteine ist in der *brca2(IV)/(V)*-Mutante nicht beeinträchtigt, daher sind die Chromosomenfragmentierungen auf DNA-Brüche zurückzuführen, die durch SPO11-1 und SPO11-2 eingebracht werden. Doch wie ist das Entstehen von Chromosomenbrücken zu erklären? Eine Möglichkeit wäre, dass DNA-Einzelstränge, die die Positionen von DSBs markieren, zufällig, z.B. aufgrund räumlicher Nähe, auf homologe Sequenzen treffen und einen RAD51-unabhängigen Strangaustausch durchführen. Da jedoch nachgeschaltete Faktoren aufgrund des Fehlens von BRCA2 (und höchstwahrscheinlich auch RAD51), die Stelle des Strangaustauschs nicht erkennen und die Rekombination damit nicht fortschreiten kann, bleiben die entsprechenden Chromosomenabschnitte miteinander verbunden. Dies könnte zum einen zur Bildung von DNA-Brücken führen oder bei Segregationsbewegungen zur Chromosomenfragmentierung beitragen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es zur Verknüpfung von DNA-Brüchen mittels NHEJ-vermittelter DNA-Reparatur kommt. Auch wenn in meiotischen Zellen die homologe Rekombination der vorherrschende Weg zur Reparatur der DNA-Brüche ist, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere Reparaturwege eingeschlagen werden; vor allem dann, wenn der Mechanismus der HR gestört ist. Durch die Verknüpfung von DNA-Enden mittels NHEJ wäre es denkbar, dass es zur Verbindung von Chromosomen kommt, was dazu führen würde, dass zwei (oder mehr) Centromerbereiche pro Fusionskonstrukt entstehen. Auch dies würde zu Fragmentierungen und Brückenbildungen, vor allem während der folgenden Segregationsprozesse führen.

Vergleicht man die chromosomalen Aberrationen der *brca2(IV)/(V)*-Mutante (Abb. 25, Seite 72) mit den Defekten der *rad51*-Mutante (Abb. 26, Seite 74), so fällt auf, dass die beiden Mutationen analoge meiotische Phänotypen hervorbringen. Bereits das Erscheinungsbild von Blütenpollen, das durch DIC-mikroskopische Untersuchungen aufgezeigt wurde, ließ eine große

Ähnlichkeit zwischen den beiden Mutanten erkennen. Zu Beginn dieser Diskussion wurde bereits erwähnt, dass diese Übereinstimmung möglicherweise auf die enge Zusammenarbeit von BRCA2 und RAD51 während der meiotischen Rekombination zurückzuführen ist. Die Ähnlichkeit der Defekte während der Meiose von Pollenmutterzellen spricht für diese Überlegung.

Neben *BRCA2* besitzen die meisten höheren eukaryontischen Organismen ein zweites BRCA-Gen, *BRCA1*, bei dem es sich eigentlich, der chronologischen Reihenfolge ihrer Entdeckung entsprechend, um das erste Gen handelt (Hall et al., 1990; Wooster et al., 1994). Mutationen in einem der beiden Gene können bereits bei jungen Frauen Brustkrebs verursachen (siehe Reviews Rahman und Stratton, 1998; Venkitaraman, 2002), was den Proteinen ihren Namen gegeben hat – BRCA, steht für Breast Cancer Susceptibility Gene. Bis auf die pathogene Wirkung der Mutationen haben diese Proteine, trotz des ähnlich klingenden Namens, auf funktioneller Ebene wenig gemeinsam. Beides sind wichtige Faktoren der Reparatur von DNA-Schäden, doch während BRCA2 als Mediator von RAD51 direkt an der homologen Rekombination beteiligt ist (Venkitaraman, 2001; Yu et al., 2003; Min et al., 2007), hat BRCA1 als E3-Ubiquitinligase wichtige Funktionen bei der Erkennung von DNA-Schäden, als Transkriptionsfaktor und während der Zellzyklus-Kontrolle (Chen et al., 1996; Jin et al., 1997; Ruffner und Verma, 1997; Paull et al., 2001; Mallery et al., 2002; Brzovic et al., 2003; Horwitz et al., 2007). Der Ausfall eines der beiden Proteine führt bei Säugetieren zu embryonaler Letalität (Gowen et al., 1996; Sharan et al., 1997). Dagegen sind T-DNA-Insertionsmutanten der Gene BRCA1 und BRCA2 von *Arabidopsis thaliana* vital und entwickeln sich bis zu einem adulten Organismus (Reidt et al., 2006; vorliegende Arbeit). Im Unterschied zur *brca2(IV)/(V)*-Doppelmutante, sind *brca1*-Mutanten jedoch fertil (Reidt et al., 2006), was bedeutet, dass BRCA1, zumindest in *A. thaliana*, keinen Einfluss auf den Ablauf der Meiose hat.

Wie *brca1* und *brca2(IV)/(V)* sind auch Mutanten anderer Reparaturgene, wie *rad51* (Li et al., 2004), *rad51c* (Abe et al., 2005; Li et al., 2005) oder *mnd1* (Kerzendorfer et al., 2006; Panoli et al., 2006) in der Lage, zumindest während des vegetativen Wachstums, vitale Pflanzen zu entwickeln. Dies macht *A. thaliana* zu einem wertvollen Modellorganismus für die Untersuchung der Funktion dieser Proteine, da das Ausschalten essentieller Faktoren der DNA-Reparatur oder Meiose in mammalischen Systemen oft mit embryonaler Letalität einhergeht (z.B. Gowen et al., 1996; Tsuzuki et al., 1996; Sharan et al., 1997).

4.3.3 Die *top3 α* -Mutante

Die *top3 α* -Mutante nimmt innerhalb der bisher beschriebenen Mutanten eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu den bisherigen Mutanten ist sie in der Lage das Pachytän-Stadium vollständig abzuschließen (Abb. 27 B, Seite 75), was bedeutet, dass die Synapsis homologer Chromosomen stattfinden kann. Erste Defekte treten während des Diplotäns auf und werden nach weiterer Kondensation der Chromosomen im Laufe der Diakinese noch deutlicher. Ein Charakteristikum des Diplotän-Stadiums in Wildtyp-Zellen ist das Auseinanderstreben der homologen Chromosomen durch Auflösung des synaptonemalen Komplexes. Die Chromosomen bleiben dabei weiterhin über Chiasmata, die sich während der vorausgegangenen Rekombinationsprozesse gebildet haben, verbunden (Armstrong und Jones, 2003). Defekte während der Diakinese deuten darauf hin, dass es zu Störungen während der Trennung der homologen Chromosomen kommt. Ursache dafür könnte sein, dass der SC nicht aufgelöst wird und die Chromosomen aneinander haften bleiben. Dies könnte auch die schweren Fragmentierungen erklären, die während der ersten meiotischen Teilung entstehen (Abb. 27 F, Seite 75). Gegen diese Annahme spricht, dass es bisher keinerlei Hinweise dafür gibt, dass TOP3 α an der Auflösung der SC-Struktur beteiligt ist. Dagegen wurde gezeigt, dass TOP3 α in Zusammenarbeit mit BLM in der Lage ist, *in vitro* dHJ-Strukturen aufzulösen (Wu und Hickson, 2003; Plank et al., 2006). Die Resolvase-Aktivität des Komplexes wird in Assoziation mit BLAP75/RMI1 noch gesteigert (Chang et al., 2005; Cheok et al., 2005; Mullen et al., 2005; Yin et al., 2005; Raynard et al., 2006; Wu et al., 2006; Bussen et al., 2007; Chen und Brill, 2007). In *S. cerevisiae* wurde außerdem nachgewiesen, dass die Deletion von TOP3 zu Störungen während der Sporenbildung führt. In *top3*-Zellen von *S. cerevisiae* wurden die ersten Schritte der meiotischen Rekombination zwar durchgeführt, die Meiose kam jedoch nach der Ausbildung von Rekombinationsintermediaten zum Stillstand (Gangloff et al., 1999).

Während des Übergangs vom Pachytän zum Diplotän müssen alle Rekombinationsprodukte, bis auf Chiasmata, aufgelöst sein, damit das Auseinanderstreben der homologen Chromosomen möglich ist. Da bei *top3 α* die ersten Störungen während des Diplotäns auftreten, scheint die Mutante nicht in der Lage zu sein, das Auflösen dieser Intermediate zu bewerkstelligen. Doch es bestehen verschiedene Arten von Rekombinationsprodukten und auch verschiedene Möglichkeiten diese wieder aufzuheben. Es wurde vorgeschlagen, dass TOP3/TOP3 α an der Auflösung von dHJ durch konvergente Branchmigration beteiligt ist und dieser

Weg ausschließlich in der Bildung von Noncrossover-Produkten resultiert (Plank et al., 2006; siehe auch Review Wang, 2002). Aufgrund der in dieser Arbeit mit der *top3 α* -Mutante gewonnenen Ergebnisse, wäre es daher denkbar, dass TOP3 α auch in Pflanzen eine entsprechende Funktion zukommt. Somit wäre TOP3 α vor allem oder ausschließlich für die Auflösung früher Rekombinationsknoten und der Bildung von Noncrossover verantwortlich. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass TOP3 α auch eine Beteiligung an der Auflösung von Crossover-Produkten zukommt und vielleicht Einfluss auf Mechanismen nach dem Pachytän besitzt, auch wenn es derzeit keine Daten gibt, die auf eine solche Funktion hinweisen.

Eine interessante Beobachtung ist, dass die Meiose innerhalb der *top3 α* -Mutante nach der ersten Teilung abgebrochen wird. Es wäre denkbar, dass vor der Segregation von Schwesterchromatiden, die Trennung der homologen Chromosomen abgeschlossen sein muss. So könnte z.B. die vollständige Trennung der Homologen als Signal dienen, das der Zelle andeutet mit der Segregation der Schwesterchromatiden fortfahren zu können. Da homologe Chromosomen in *top3 α* aneinander haften bleiben, wäre möglich, dass dieses Signal nicht gegeben werden kann. Interessant werden im Hinblick darauf Studien zur Charakterisierung der männlichen Meiose von *AtRMI1* und *RecQ4A*, bei dem es sich wahrscheinlich um das *A. thaliana*-Homologe des menschlichen BLM handelt (Hartung et al., 2007b). Sollte in *A. thaliana* ein Komplex existieren mit einer analogen Funktion zum BLM/TOP3 α /BLAP75-Komplex, so wäre es möglich, dass *AtTOP3 α* , *AtRMI1* und *RecQ4A* Komponenten dieses Komplexes sind. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob es in allen drei Fällen zum Abbruch der Meiose nach der ersten Teilung kommt. Die Untersuchung von Mutanten mit Defekten während der Disassemblierung des SC im Stadium des Diplotäns wäre ebenfalls sehr aufschlussreich; entsprechende Publikationen liegen bisher jedoch noch nicht vor.

Die hier gewonnenen Daten aus der Untersuchung von *top3 α* -Meiozyten sind die ersten Ergebnisse, die auf eine Beteiligung von TOP3 α während der Meiose eines höheren eukaryontischen Organismus hinweisen. Da TOP3 α *in vivo* an der Auflösung von dHJ-Substraten beteiligt ist (Wu und Hickson, 2003; Plank et al., 2006) kann vermutet werden, dass *AtTOP3 α* eine ähnliche Funktion während der Meiose erfüllt. Bei den Rekombinationsintermediaten, die *AtTOP3 α* als Substrate erkennt, handelt sich möglicherweise auch um dHJ. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch keine Rückschlüsse darauf zu, ob aus der Aktivität von TOP3 α tatsächlich ausschließlich Noncrossover entstehen.

Die Funktion von TOP3 α scheint sich in *Arabidopsis* nicht auf die meiotische Rekombination zu beschränken. Bereits während der vegetativen Wachstumsphase zeigt diese Mutante Fehlentwicklungen, die sich z.B. durch Verwachsungen von Infloreszenzen äußern (Frank Hartung, persönliche Kommunikation). Auch die Blütenbildung ist durch morphologische Veränderungen, wie Abweichungen der Anzahl von Blüten- und Staubblätter und Missbildungen des Fruchtknotens, geprägt (Abb. 17, Seite 61). Die mikroskopische Untersuchung DAPI-gefärbter Mitosezellen hat gezeigt, dass die Mutante einen hohen Anteil fehlerhafter Mitosen enthält. In etwa ein Fünftel bis ein Viertel der Zellen, die sich in der Anaphase oder Telophase befinden, zeigen Chromosomenaberrationen wie Brückenbildungen und/oder Fragmentierungen (Abb. 31, Seite 79). Dies erklärt die morphologischen Fehlentwicklungen während des vegetativen Wachstums und der Blütenbildung. Durch Studien an Hefe- und Vertebraten-Zellen wurde vorgeschlagen, dass TOP3/TOP3 α an der Auflösung von Rekombinationsintermediaten beteiligt ist und die Blockade von Replikationsgabeln, die zur Bildung von Doppelstrangbrüchen führen würde, verhindert (Li und Wang, 1998; Chakraverty et al., 2001; Hu et al., 2001; Oh et al., 2002; Wu und Hickson, 2003; Rao et al., 2005). Seki et al., 2006 präzisierten diese Theorie durch Untersuchungen an Huhn-Zellen. Sie schlagen ein Modell vor, indem TOP3 α vor allem an aufeinander treffenden Replikationsgabeln aktiv und für die Trennung von Schwesterchromatiden verantwortlich ist (Seki et al., 2006). Interessanterweise findet diese Arbeitsgruppe eine verlängerte G2-Phase in *top3 α '*-Zellen vor und eine Unterbrechung des Übergangs von der Metaphase zur Anaphase, die von der Bildung aberranter Chromosomen begleitet ist. Ein Phänotyp der den Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit ähnlich ist. TOP3 α könnte in somatischen Zellen auf verschiedenen Ebenen arbeiten, um die Integrität der DNA zu gewährleisten. Die homologe Rekombination ist während der S- und der G2-Phase mitotischer Zellen der bevorzugte Reparaturweg (Takata et al., 1998; Sonoda et al., 1999). In Anbetracht der Theorie, dass TOP3 α an der Auflösung von dHJ-Intermediaten beteiligt ist (Wu und Hickson, 2003; Plank et al., 2006), wäre demnach denkbar, dass TOP3 α sowohl an Replikationsgabeln arbeitet, als auch zur Auflösung von Rekombinationsintermediaten während der HR benötigt wird. Für die Funktion von TOP3 α während der Meiose könnte dies bedeuten, dass das Protein nicht nur an der Auflösung von Rekombinationsprodukten zwischen homologen Chromosomen, sondern auch zwischen Schwesterchromatiden beteiligt ist.

4.3.4 Doppelmutanten unterschiedlicher Rekombinationsfaktoren

Doppelmutanten, die aus der Kreuzung von T-DNA-Insertionslinien unterschiedlicher Rekombinationsfaktoren stammen, zeigen charakteristische meiotische Eigenschaften, die die bisher aus der Untersuchung von Einzelmutanten gewonnenen Schlüsse untermauern können. Außerdem kann der meiotische Phänotyp einer Doppelmutante eine Aussage darüber liefern, ob zwei Proteine am gleichen Pathway beteiligt sind und in welcher Abfolge die Funktion der beiden Faktoren Einsatz findet. Im Folgenden soll zunächst eine grobe Betrachtung der Ergebnisse aus mikroskopischen Analysen der Doppelmutanten gegeben werden, bevor die Phänotypen anschließend genauer diskutiert werden.

In Abbildung 28 (Seite 76) ist zu sehen, dass durch das Ausschalten der SPO11-2-Funktion in *rad51*, der *rad51*-Phänotyp während der männlichen Meiose weitgehend aufgehoben wird. Die Doppelmutante zeigt typische chromosomale Eigenschaften der *spo11-2*-Mutante. So erscheinen während des Diplotäns und der Diakinese Univalente mit größtenteils unfragmentierten Chromosomen (Abb. 28 B, C, Seite 76). Ähnliche Resultate erzielten Li et al. (2004) durch Untersuchung einer *spo11-1/rad51*-Doppelmutante. Auch eine Doppelmutation *top3α/spo11-2* führt fast vollständig zur Unterdrückung des *top3α*-Phänotyps. Während *top3α* in der Lage ist Pachytän-Chromosomen zu bilden und damit die Synapsis der Homologen zu durchlaufen, findet innerhalb der *top3α/spo11-2*-Doppelmutante, wie auch in *spo11-2* keine Bivalentbildung statt. Massive Fragmentierungen der Chromosomen und Brückenbildungen, wie sie bei *top3α* vor allem während der ersten Anaphase auftreten (Abb. 27 F, Seite 75), sind bei *top3α/spo11-2* nicht zu finden; auch wenn in wenigen Fällen Chromosomenbruchstücke vorhanden sind (Abb. 29 E, Seite 77). Die Aufhebung chromosomaler Fragmentierungen bei *top3α/spo11-2*, *spo11-2/rad51* und *spo11-1/rad51* weist darauf hin, dass es in allen drei Fällen nicht zur Bildung von Doppelstrangbrüchen kommt. Die Funktion der nachgeschalteten Faktoren, in diesem Fall RAD51 und TOP3α, kommt daher nicht mehr zum Tragen, da die weiteren Schritte der meiotischen Rekombination nicht eingeleitet werden. Damit wird zum einen bekräftigt, dass sowohl SPO11-1 als auch SPO11-2 an der Bildung von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Die Ergebnisse geben jedoch auch einen Hinweis darauf, dass RAD51 und TOP3α Aufgaben erfüllen, die zu einem späteren Zeitpunkt der meiotischen Rekombination benötigt werden.

Sowohl *rad51*- als auch *top3α*-Meiozyten sind durch das Auftreten schwerer Chromosomenfragmentierungen und Brückenbildungen charakterisiert. Es stellte sich nun die Frage,

welcher Phänotyp sich aus der Kreuzung von *rad51* und *top3α* ergibt. Im Vergleich zur *top3α*-Mutante ist die Doppelmutante nicht mehr zur Bivalentbildung fähig; Pachytän-Stadien, die bei *top3α* vorhanden sind, können bei der Doppelmutante nicht beobachtet werden (Abb. 30 B, Seite 78). Auffällig ist auch, dass *top3α/rad51* die zweite meiotische Teilung durchlaufen kann, während bei *top3α* die Meiose nach der ersten Teilung abbricht (Abb. 27 G, H, Seite 75). Diese Eigenschaften zeigen, dass der Phänotyp von *top3α* durch *rad51* aufgehoben wird und die chromosomalen Aberrationen der Doppelmutante denen der *rad51*-Mutante entsprechen. Damit scheint RAD51 eine TOP3α vorgeschaltete Funktion zu erfüllen. Da bekannt ist, dass RAD51 den Strangaustausch zwischen homologen Chromosomenabschnitten katalysiert (Sung, 1994; Sung und Robberson, 1995), bestätigen diese Beobachtungen, dass TOP3α eine Funktion erfüllt, die erst in späteren Rekombinationsschritten Einsatz findet. Die Ergebnisse bekräftigen damit die Vermutung, dass TOP3α in *A. thaliana* an der Auflösung von Rekombinationsintermediaten beteiligt ist.

Die Untersuchung der Doppelmutanten haben Beobachtungen und Interpretationen, die aus Ergebnissen der Einzelmutanten gewonnen wurden, eindrücklich bestätigt. Es kann damit eine Wirkungsabfolge der Proteine erstellt und das Schema des DSBR-Modell in Abbildung 9 (Seite 21) zu der in Abbildung 32 gezeigten Darstellung ergänzt werden.

4.3.5 Chromosomenfragmente in Doppelmutanten unterschiedlicher Rekombinationsfaktoren

In den oberen Abschnitten wurde mehrfach erwähnt, dass das Ausschalten von SPO11-2 im *rad51*- und im *top3α*-Hintergrund, die meiotischen Phänotypen von *rad51* und *top3α* weitgehend aufhebt. Diese Aussage schließt mit ein, dass die meiotischen Eigenschaften von *rad51* und *top3α* nicht vollständig unterdrückt werden. So weist die Doppelmutante *spo11-2/rad51* in wenigen Fällen Chromosomenfragmente auf, wie hier am Beispiel der Metaphase I (Abb. 28 D, Seite 76) gezeigt wurde. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen von Li et al. (2004) an einer *spo11-1/rad51*-Doppelmutante, da hier Chromosomenfragmentierungen, die durch Ausschalten von RAD51 entstehen, vollständig aufgehoben werden. Auch die Doppelmutation *top3α/spo11-2* führte zwar größtenteils zur Unterdrückung von Fragmentierungen, doch waren vereinzelt Chromosomenbruchstücke zu finden (Abb. 29 E, Seite 77). Ähnliche Beobachtungen wurden

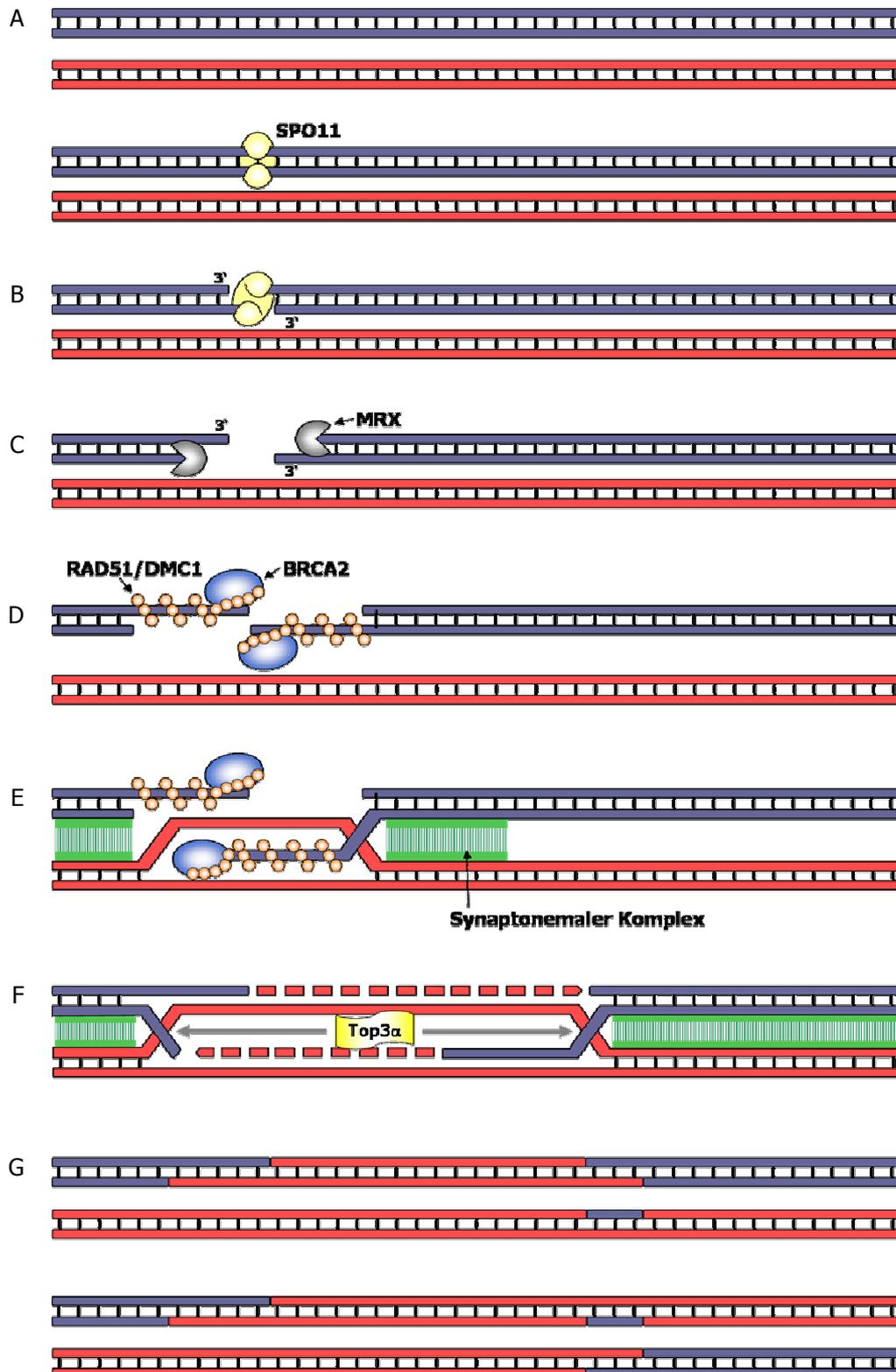


Abb. 32: Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach dem DSBR-Modell.
(Erläuterung s. S 100)

durch das Ausschalten der SPO11-1-Funktion in einer *Atmre11*-Mutante (Puizina et al., 2004) und einer *Atrad51C*-Mutante (Li et al., 2005) gemacht. Hierfür könnten verschiedene Ursachen in Frage kommen. Eine Erklärung wäre, dass es sich bei den zur Herstellung der Doppelmutanten verwendeten *spo11-1*- und *spo11-2*-Linien (Li et al., 2004; Puizina et al., 2004; Li et al., 2005; Hartung et al., 2007a; vorliegende Arbeit) nicht um absolute Nullmutanten handelt. Die verbleibenden Brüche wären dann durch die Restaktivität von SPO11-1 bzw. SPO11-2 bedingt. Wie bereits diskutiert wurde, könnte diese Restaktivität auch für die Bildung der Minderheit an Bivalenten in *spo11-1*- und *spo11-2*-Mutanten (Grelon et al., 2001; vorliegende Arbeit) verantwortlich sein. Unterschiede bezüglich des Schweregrades an Chromosomenfragmentierungen in Doppelmutanten könnten darauf zurückzuführen sein, welche *spo11-1*- bzw. *spo11-2*-Linie zur Kreuzung verwendet wurde (Li et al., 2004; Puizina et al., 2004; Li et al., 2005; Hartung et al., 2007a; vorliegende Arbeit). Zumindest für die Untersuchung der *spo11-1-3*- und *spo11-2-3*-Mutanten in dieser Arbeit, muss die Beobachtung, dass nicht immer zehn Univalente pro Zelle zu finden sind, wie unter Kapitel 4.3.1 bereits diskutiert wurde, nicht zwangsläufig in der Bildung von Bivalenten begründet sein. Es ist auch möglich, dass aufgrund der räumlichen Struktur der Zelle nicht alle Chromosomen sichtbar sind.

Unter der Voraussetzung, dass es sich bei den verwendeten *spo11*-Mutanten (Li et al., 2004; Puizina et al., 2004; Li et al., 2005; Hartung et al., 2007a; vorliegende Arbeit) tatsächlich um Nullmutanten handelt, soll eine weitere Möglichkeit der Bruchbildung in Doppelmutanten aus einem der beiden SPO11-Orthologen und einem weiteren Rekombinationsenzym diskutiert werden. Sollte in *spo11-1*- und *spo11-2*-Mutanten keine Restaktivität von SPO11-1 bzw. SPO11-2

(Fortsetzung Abb. 32) Es ist jeweils ein Chromosom, bestehend aus zwei Schwesterchromatiden in blau und das homologe Chromosom in rot dargestellt. **A**, Homologe Chromosomen, an die SPO11 bindet; dies könnte SPO11-1 oder SPO11-1 und SPO11-2 sein; **B**, SPO11-1/SPO11-2 setzt einen Doppelstrangbruch (DSB) und bleibt mit den DNA-Enden verbunden; **C**, der MRX-Komplex verdrängt SPO11 aus seiner Assoziation mit der DNA und baut die DNA-Enden in 5'→3'-Richtung nukleolytisch ab, es entstehen 3'-Einzelstrang-Überhänge; **D**, BRCA2 dirigiert RAD51 an die Stelle des DNA-Bruchs und RAD51 bildet Nukleoproteinfilamente; **E**, Single-End-Invasion, ein Einzelstrang führt einen Strangaustausch mit dem homologen Bereich eines Partnerchromosoms durch, an Rekombinationsstellen beginnt die Assemblierung des synaptonemalen Komplexes (SC); **F**, der zweite Strang dringt in den homologen Bereich ein, es entsteht eine double Holliday Junction (dHJ), die DNA-Synthese findet statt, Proteine zur Auflösung der dHJ-Struktur lagern sich an das Rekombinationsintermediat an, darunter TOP3 α , der Aufbau des SC wird entlang der Chromosomenachsen weitergeführt und vervollständigt. **G**, Auflösung des Rekombinationsprodukts, es kann ein Crossover (unten) oder ein Noncrossover (oben) entstehen.

bestehen, würden die Ergebnisse von Li et al. (2004), Puizina et al. (2004), Li et al. (2005), Hartung et al. (2007a) und der vorliegenden Arbeit eigentlich für eine additive Funktion von SPO11-1 und SPO11-2 sprechen. Die beobachteten DNA-Fragmente könnten jeweils durch das noch funktionelle Protein eingefügt werden. Da die Doppelmutation *spo11-1/spo11-2*, wie hier gezeigt wurde, jedoch keinen synergistischen Effekt ergibt, muss es eine andere Erklärung für dieses Phänomen geben. Es wäre z.B. denkbar, dass es zwei (oder mehr) Wege gibt, die zur Bildung von Doppelstrangbrüchen führen. Dabei scheint die Anheftung der Proteine entweder gleichzeitig zu erfolgen oder die Anlagerung des einen Proteins ist Voraussetzung für das Binden des zweiten Proteins. Bei der zweiten Variante könnte das erste Protein SPO11-1 sein, da gezeigt wurde, dass SPO11-1 lange bevor DSBs gebildet werden bereits mit der DNA assoziiert ist (Sanchez-Moran et al., 2007). Untersuchungen an *S. cerevisiae* zeigen, dass auch in diesem Organismus eine SPO11-DNA-Assoziation besteht bevor DSBs gebildet werden (Prieler et al., 2005). Diese SPO11-1-DNA-Komplexe könnten anschließend SPO11-2 an die Stelle rekrutieren, an der bereits SPO11-1 bindet. SPO11-2 könnte daraufhin entweder einen funktionellen Komplex mit SPO11-1 eingehen oder SPO11-1 aus seiner Assoziation mit der DNA verdrängen. Dabei könnte SPO11-1 auch SPO11-2-unabhängige Funktionen erfüllen, was die stärkere Beeinträchtigung der Fertilität der *spo11-1-3*-Mutante im Vergleich zur *spo11-2-3*-Mutante erklären würde. Ein Hinweis auf eventuell zwei verschiedene SPO11-Wege könnte auch die Tatsache geben, dass der *rad51*-Phänotyp durch *spo11-1* völlig aufgehoben wird (Li et al., 2004), während *spo11-2* die Chromosomenfragmentierung durch *rad51* zwar weitgehend verhindert, einige Fragmente aber immer noch gebildet werden. Interessant werden diesbezüglich die Ergebnisse der Doppelmutation *spo11-1/top3α* (Frank Hartung, persönliche Kommunikation); wäre in dieser Doppelmutante die Fragmentierung durch *top3α* vollständig aufgehoben, während *spo11-2* dies nur größtenteils bewirkt, so würde dies für die Theorie der unterschiedlichen SPO11-Wege sprechen. In *spo11-2/rad51* und *top3a/spo11-2* könnten demnach nur die Brüche zu sehen sein, die durch eine SPO11-2-unabhängige Funktion von SPO11-1 gebildet werden. Die beiden unterschiedlichen Wege zur Bildung von Doppelstrangbrüchen könnten anschließend unterschiedliche Rekombinationsfaktoren an die Stelle des Bruches rekrutieren und damit zwei getrennte Wege einleiten. Dies könnte erklären, weshalb in manchen Fällen nach Ausschalten von SPO11-1 noch vereinzelt Brüche zu sehen sind, wie für die *mre11/spo11-1*- und die *rad51C/spo11-1*-Doppelmutanten gezeigt wurde (Puizina et al., 2004; Li et al., 2005), und in anderen Fällen nach Ausschalten von SPO11-2, wie in *rad51/spo11-2* und *top3α/spo11-2*. Um

jedoch diesbezüglich sichere Aussagen zu treffen, ist die Herstellung weiterer Doppelmutanten notwendig. Kreuzungen zwischen *top3α* und *spo11-1*, *mre11* und *spo11-2* und *rad51C* und *spo11-2* fehlen, um aufschlussreiche Hinweise für (oder eventuell gegen) diese Annahme zu finden. Des Weiteren wäre es interessant festzustellen, ob oder inwieweit das Vorhandensein zweier SPO11-Wege mit der MUS81- und MSH4-abhängigen Bildung von Crossover korreliert ist. In *Arabidopsis thaliana* existieren mindestens zwei Wege zur Bildung von Crossover während der Meiose. Es konnte gezeigt werden, dass der MUS81-abhängige Weg zur Bildung Interferenz-unabhängiger Crossover führt (Berchowitz et al., 2007), während durch MSH4 Interferenz-abhängige Crossover entstehen (Higgins et al., 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl SPO11-1, SPO11-2, BRCA2(IV)/BRCA2(V) als auch TOP3α eine essentielle Rolle während der meiotischen Entwicklung männlicher und weiblicher Gameten spielen. Die Resultate bekräftigen noch einmal, dass sowohl SPO11-1 als auch SPO11-2 an der Bildung von Doppelstrangbrüchen während der meiotischen Rekombination beteiligt ist. Entgegen der bisherigen Annahme, dass SPO11-1 und SPO11-2 additive Funktionen besitzen könnten (Grelon et al., 2001), wurde hier gezeigt, dass die beiden Proteine eine funktionelle Abhängigkeit aufweisen. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass BRCA2 nicht nur während der Meiose männlicher und weiblicher Gametophyten eine essentielle Aufgabe erfüllt, sondern auch während des vegetativen Wachstums von *A. thaliana* eine wichtige Funktion in der Reparatur von DNA-Schäden übernimmt. TOP3α hat sich als bedeutender Faktor während des vegetativen Wachstums von *A. thaliana* erwiesen, da das Ausschalten von TOP3α zu massiven Störungen während mitotischen Zellteilungen führte. Weiterhin konnte erstmals an einem höheren eukaryontischen Organismus gezeigt werden, dass TOP3α eine essentielle Funktion während der meiotischen Rekombination erfüllt.

Sicherlich fehlen noch einige Informationen, die es zulassen aus den vielen Erkenntnissen über die Vorgänge während der meiotischen Rekombination ein Gesamtbild zu erstellen. Die vorliegende Arbeit konnte jedoch neue Ergebnisse liefern, die einen wichtigen Beitrag zur Erweiterung des heutigen Wissensstandes über Rekombinationsereignisse während der Meiose leisten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Vorgänge während der Meiose und vor allem während der meiotischen Rekombination sind hoch komplexe Prozesse, die einer Vielzahl an Kontroll- und Regulationsfaktoren bedürfen. Vier dieser Proteine, die bei *Arabidopsis thaliana* eine essentielle Rolle spielen, sind SPO11-1, SPO11-2, BRCA2 und TOP3 α . Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Störungen, die durch die fehlende Funktionalität der Proteine während der Entstehung von Keimzellen auftreten, zu charakterisieren und dadurch Informationen über die Funktion der jeweiligen Faktoren zu gewinnen. Durch mikroskopische Untersuchungen konnten für alle untersuchten Mutanten gravierende Entwicklungsstörungen männlicher und weiblicher Gametophyten nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass SPO11-1 und SPO11-2 eine essentielle Rolle während der Bildung von Doppelstrangbrüchen und damit der Initiation der meiotischen Rekombination spielen, was Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Weiterhin konnte durch die Herstellung einer doppelt-homozygoten *spo11-1/spo11-2*-Mutante die bisherige Annahme einer ergänzenden Funktion von SPO11-1 und SPO11-2 eindeutig widerlegt werden. Tatsächlich sprechen die hier erhaltenen Resultate für eine funktionelle Abhängigkeit der beiden Enzyme.

Durch frühere Experimente einer anderen Arbeitsgruppe war postuliert worden, dass BRCA2 eine wichtige Rolle während der Meiose von Pollenmutterzellen in *A. thaliana* spielt. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass BRCA2 nicht nur sehr wichtig, sondern essentiell für die Entwicklung sowohl männlicher als auch weiblicher Gametophyten ist. Resultate aus der Behandlung von *brca2(IV)/(V)*-Keimlingen mit genotoxischen Agenzien zeigten, dass BRCA2 in *A. thaliana* eine Beteiligung an der Reparatur von DNA-Schäden somatischer Zellen hat. Dass *brca2(IV)*- und *brca2(V)*-Einzelmutanten keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp aufweisen, deutet außerdem auf eine redundante Funktion der Proteine BRCA2(IV) und BRCA2(V) hin.

Aus Untersuchungen männlicher und weiblicher Gametophyten der *top3 α* -Mutante geht hervor, dass TOP3 α in *A. thaliana* eine essentielle Funktion während der Meiose zukommt. Ergebnisse aus Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen sprechen für eine Beteiligung von TOP3 α an der Auflösung meiotischer Rekombinationsintermediate. Trotz deutlicher Hinweise aus *in vitro*-Experimenten wurde dies interessanterweise bisher an keinem weiteren höheren eukaryontischen Modellorganismus gezeigt.

Analysen chromosomaler Aberrationen, die bei Doppelmutanten unterschiedlicher Rekombinationsfaktoren auftraten, bestätigen eindrücklich die aus der Untersuchung von Einzelmutanten gewonnenen Ergebnisse. Mit Hilfe der Resultate aus Untersuchungen dieser Doppelmutanten konnte ein Modell der chronologischen Abfolge erstellt werden, in der SPO11-1 und SPO11-2, BRCA2 und TOP3 α nacheinander ihre Funktion erfüllen. Die vorliegende Arbeit konnte damit eine Reihe neuer Erkenntnisse zum Ablauf der meiotischen Rekombination bei Pflanzen liefern und einen wichtigen Beitrag zur Vervollständigung des komplexen Meiosepuzzles leisten.

6 LITERATUR

A

- ABE, M., KOBAYASHI, Y., YAMAMOTO, S., DAIMON, Y., YAMAGUCHI, A., IKEDA, Y., ICHINOKI, H., NOTAGUCHI, M., GOTO, K. UND ARAKI, T. (2005a) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309: 1052-1056
- ABE, K., OSAKABE, K., NAKAYAMA, S., ENDO, M., TAGIRI, A., TODORIKI, S., ICHIKAWA, H. UND TOKI, S. (2005b) Arabidopsis *RAD51C* gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. *Plant Physiology* 139: 896-908
- ABDU, U., GONZÁLEZ-REYES, A., GHABRIAL, A. UND SCHÜPBACH, T. (2003) The *Drosophila spn-D* gene encodes a RAD51C-like protein that is required exclusively during meiosis. *Genetics* 165: 197-204
- ABIRACHED-DARMENCY, M., ZICKLER, D. UND CAUDERON, Y. (1983) Synaptonemal complex and recombination nodules in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* 88: 299-306
- AGARWAL, S. UND ROEDER, G.S. (2000) Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell* 102: 245-255
- ALBINI, S. M. (1994) A karyotype of the *Arabidopsis thaliana* genome derived from synaptonemal complex analysis at prophase I of meiosis. *The Plant Journal* 5: 665–672
- ALLERS, T. UND LICHTEN, M. (2001a) Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 106: 47-57
- ALLERS, T. UND LICHTEN, M. (2001b) Intermediates of yeast meiotic recombination contain heteroduplex DNA. *Molecular Cell* 8: 225-231
- ANDERSON, L.K., OFFENBERG, H.H., VERKUIJLEN, W.M.H.C. UND HEYTING, C. (1997) RecA-like proteins are components of early meiotic nodules in lily. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94: 6868-6873
- ARBEL, A., ZENVIRTH, D. UND SIMCHEN, G. (1999) Sister chromatid-based DNA repair is mediated by *RAD54*, not by *DMC1* or *TID1*. *The EMBO Journal* 18: 2648-2658
- ARGUESO, J.L., WANAT, J., GEMICI, Z. UND ALANI, E. (2004) Competing crossover pathways act during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 168: 1805-1816
- ARMSTRONG, S.J., FRANKLIN, F.C. UND JONES, G.H. (2001) Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science* 114: 4207-4217

- ARMSTRONG, S.J. UND JONES, G.H. (2001) Female meiosis in wild-type *Arabidopsis thaliana* and in two meiotic mutants. *Sexual Plant Reproduction* 13: 177-183
- ARMSTRONG, S.J. UND JONES, G.H. (2003) Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 54: 1-10
- ARORA, C., KEE, K., MALEKI, S. UND KEENEY, S. (2004) Antiviral protein Ski8 is a direct partner of Spo11 in meiotic DNA break formation, independent of its cytoplasmic role in RNA metabolism. *Molecular Cell* 13: 549-559
- ASHLEY, T., PLUG, A.W., XU, J., SOLARI, A.J., REDDY, G., GOLUB, E.I. UND WARD, D.C. (1995) Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosoma* 104: 19-28

B

- BACHRATI, C.Z. UND HICKSON, I.D. (2003) RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochemical Journal* 374: 577-606
- BÄHLER, J., WYLER, T., LOIDL, J. UND KOHLI, J. (1993) Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: a cytological analysis. *The Journal of Cell Biology* 121: 241-256
- BAI, X., PEIRSON, B.N., DONG, F., XUE, C. UND MAKAROFF, C.A. (1999) Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11: 417-430
- BAJON, C., HORLOW, C., MOTAMAYOR, J.C., SAUVANET, A., UND ROBERT, D. (1999) Megasporogenesis in *Arabidopsis thaliana* L.: An ultrastructural study. *Sexual Plant Reproduction* 12: 99-109
- BARLOW, A.L., BENSON, F.E., WEST, S.C. UND HULTÉN, M.A. (1997) Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *The EMBO Journal* 16: 5207-5215
- BARLOW, A.L., HULTÉN, M.A. (1996) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Research* 4: 562-573
- BARLOW, C., LIYANAGE, M., MOENS, P.B., TARSOUNAS, M., NAGASHIMA, K., BROWN, K., ROTTINGHAUS, S., JACKSON, S.P., TAGLE, D., RIED, T. UND WYNshaw-BORIS, A. (1998) *Atm* deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I. *Development* 125: 4007-4017

- BASCOM-SLACK, C.A., ROSS, L.O. UND DAWSON, D.S. (1997) Chiasmata, crossovers, and meiotic chromosome segregation. *Advances in Genetics* 35: 253-284
- BASS, H.B., MARSHALL, W.F., SEDAT, J.W., AGARD, D.A. UND CANDE, W.Z. (1997) Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *The journal of cell biology* 137: 5-18
- BASS, H., RIERA-LIZARAZU, O., ANANIEV, E., BORDOLI, S., RINES, H., PHILLIPS, R., SEDAT, J., AGARD, D. UND CANDE, W. (2000) Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *Journal of Cell Science* 113: 1033-1042
- BAUDAT, F., MANOVA, K., YUEN, J.P., JASIN, M. UND KEENEY, S. (2000) Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Molecular Cell* 6: 989-998
- BERCHOWITZ, L.E., FRANCIS, K.E., BEY, A.L. UND COPENHAVER, G.P. (2007) The role of *AtMUS81* in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genetics* 3: e132
- BERGERAT, A., DE MASSY, B., GADELLE, D., VAROUTAS, P.C., NICOLAS, A. UND FORTERRE, P. (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386: 414-417
- BHATT, A.M., LISTER, C., PAGE, T., FRANSZ, P., FINDLAY, K., JONES, G.H., DICKINSON, H.G. UND DEAN, C. (1999) The *DIF1* gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the *REC8/RAD21* cohesin gene family. *The Plant Journal* 19: 463-472
- BIGNELL, G., MICKLEM, G., STRATTON, M.R., ASHWORTH, A. UND WOOSTER, R. (1997) The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Human Molecular Genetics* 6: 53-58.
- BIRD, J., POTER, E.K. UND DICKINSON, H.G. (1983). Events in the cytoplasm during male meiosis in *Lilium*. *Journal of Cell Science* 59: 27-42
- BISHOP, D.K., NIKOLSKI, Y., OSHIRO, J., CHON, J., SHINOHARA, M. UND CHEN, X. (1999) High copy number suppression of the meiotic arrest caused by a *dmc1* mutation: *REC114* imposes an early recombination block and *RAD54* promotes a *DMC1*-independent DSB repair pathway. *Genes to Cell* 4: 425-443
- BISHOP, D.K., PARK, D., XU, L. UND KLECKNER, N. (1992) *DMC1*: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69: 439-456

- BISHOP, D.K. (1994) RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell* 79: 1081-1092
- BLAT, Y., PROTACIO, R.U., HUNTER, N. UND KLECKNER, N. (2002) Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation. *Cell* 111: 791-802
- BLÁZQUEZ, M.A., FERRÁNDIZ, C., MADUEÑO, F. UND PARCY, F. (2006) How floral meristems are built. *Plant Molecular Biology* 60: 855-870
- BLÁZQUEZ, M.A., SOOWAL, L.N., LEE, I. UND WEIGEL, D. (1997) LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* 124: 3835-3844
- BLEUYARD, J.Y., GALLEGRO, M.E., SAVIGNY, F. UND WHITE, C.I. (2005) Differing requirements for the Arabidopsis Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair. *The Plant Journal* 41: 533-545
- BLEUYARD, J.Y., GALLEGRO, M.E. UND WHITE, C.I. (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, J.Y. UND WHITE, C.I. (2004) The Arabidopsis homologue of Xrcc3 plays an essential role in meiosis. *The EMBO Journal* 23: 439-449
- BOAVIDA, L.C., BECKER, J.D. UND FEIJÓ, J.A. (2005) The making of gametes in higher plants. *International Journal of Developmental Biology* 49: 595-614
- BOJKO, M. (1989) Two kinds of "recombination nodules" in *Neurospora crassa*. *Genome* 32: 309-317
- BORDE, V., GOLDMAN, A.S. UND LICHTEN, M. (2000) Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science* 290: 806-809
- BORK, P., BLOMBERG, N. UND NILGES, M. (1996) Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nature Genetics* 13: 22-23
- BÖRNER, G.V., KLECKNER, N. UND HUNTER, N. (2004) Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* 117: 29-45
- BORTS, R.H., CHAMBERS, S.R. UND ABDULLAH, M.F. (2000) The many faces of mismatch repair in meiosis. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 451: 129-150
- BOUMAN, F. (1975) Integument initiation and testa development in some Cruciferae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 70: 213-229

- BOWMAN, J.L., ALVAREZ, J., WEIGEL, D., MEYEROWITZ, E.M., UND SMITH, D.R. (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* 119: 721-743
- BOWMAN, J.L., SMYTH, D.R. UND MEYEROWITZ, E.M. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 1: 37-52
- BOWMAN, J.L., SMYTH, D.R. UND MEYEROWITZ, E.M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112: 1-20
- BOWRING, F.J., YEADON, P.J., STAINER, R.G. UND CATCHESIDE, D.E. (2006) Chromosome pairing and meiotic recombination in *Neurospora crassa spo11* mutants. *Current Genetics* 50: 115-123
- BRZOVIC, P.S., KEEFFE, J.R., NISHIKAWA, H., MIYAMOTO, K., FOX, D. 3RD., FUKUDA, M., OHTA, T. UND KLEVIT, R. (2003) Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 100: 5646-5651
- BUSSEN, W., RAYNARD, S., BUSYGINA, V., SINGH, A.K. UND SUNG, P. (2007) Holliday Junction processing activity of the BLM-Topo III α -BLAP75 complex. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 31484-31492

C

- CAI, X., DONG, F., EDELMANN, R.E. UND MAKAROFF, C.A. (2003) The *Arabidopsis* SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *Journal of Cell Science* 116: 2999-3007
- CAO, L., ALANI, E. UND KLECKNER, N. (1990) A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* 61: 1089-1101
- CARLTON, P.M., COWAN, C.R. UND CANDE, W.Z. (2003) Directed motion of telomeres in the formation of the meiotic bouquet revealed by time course and simulation analysis. *Molecular Biology of the Cell* 14: 2832-2843
- CELERIN, M., MERINO, S.T., STONE, J.E., MENZIE, A.M. UND ZOLAN, M.E. (2000) Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behaviour. *The EMBO Journal* 19: 2739-2750

- CHAGANTI, R.S., SCHONBERG, S. UND GERMAN, J. (1974) A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 71: 4508-4512
- CHAILAKHYAN, M.K. (1936). New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Comptes Rendus de l'Academie de Sciences de l'URSS* 13: 79-83
- CHANG, M., BELLAOUI, M., ZHANG, C., DESAI, R., MOROZOV, P., DELGADO-CRUZATA, L., ROTHSTEIN, R., FREYER, G.A., BOONE, C. UND BROWN, G.W. (2005) *RMI1/NCE4*, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *The EMBO Journal* 24: 2024-2033
- CHAKRAVERTY, R.K., KEARSEY, J.M., OAKLEY, T.J., GRENON, M., DE LA TORRE RUIZ, M.A., LOWNDES, N.F. UND HICKSON, I.D. (2001) Topoisomerase III acts upstream of Rad53p in the S-phase DNA damage checkpoint. *Molecular and Cellular Biology* 21: 7150-7162
- CHELYSHEVA, L., GENDROT, G., VEZON, D., DOUTRIAUX, M.P., MERCIER, R. UND GRELON, M. (2007) Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not for synapsis completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 3: e83
- CHEN, C.F. UND BRILL, S.J. (2007) Binding and activation of DNA topoisomerase III by the Rmi1 subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 28971-28979
- CHEN, P.L., CHEN, C.F., CHEN, Y., XIAO, J., SHARP, Z.D. UND LEE, W.H. (1998) The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95: 5287-5292
- CHEN, Y., FARMER, A.A., CHEN, C.F., JONES, D.C., CHEN, P.L. UND LEE, W.H. (1996) BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Research* 56: 3168-3172
- CHEN, Y.K., LENG, C.H., OLIVARES, H., LEE, M.H., CHANG, Y.C., KUNG, W.M., TI, S.C., LO, Y.H., WANG, A.H.J., CHANG, C.S., BISHOP, D.K., HSUEH, Y.P. UND WANG, T.F. (2004) Heterodimeric complexes of Hop2 and Mnd1 function with Dmc1 to promote meiotic homolog juxtaposition and strand assimilation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101: 10572-10577
- CHEN, J.J., SILVER, D., CANTOR, S., LIVINGSTON, D.M. UND SCULLY, R. (1999) BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Research* 59: 1752s-1756s.

- CHEN, C., ZHANG, W., TIMOFEJEVA, L., GERARDIN, Y. UND MA, H. (2005) The Arabidopsis *ROCK-N-ROLLERS* gene encodes a homolog of the yeast ATP-dependent DNA helicase MER3 and is required for normal meiotic crossover formation. *The Plant Journal* 43: 321-334
- CHEOK, C.F., BACHRATI, C.Z., CHAN, K.L., RALF, C., WU, L. UND HICKSON, I.D. (2005) Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochemical Society Transactions* 33: 1456-1459
- CHUA, P.R. UND ROEDER, G.S. (1998) Zip2, a meiosis-specific protein required for the initiation of chromosome synapsis. *Cell* 93: 349-359
- COEN, E.S. UND MEYEROWITZ, E.M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37
- COLAIÁCOVO, M.P., MACQUEEN, A.J., MARTINEZ-PEREZ, E., McDONALD, K., ADAMO, A., LA VOLPE, A. UND VILLENEUVE, A.M. (2003) Synaptonemal complex assembly in *C. elegans* is dispensable for loading strand-exchange proteins but critical for proper completion of recombination. *Developmental Cell* 5: 463-474
- CORBETT, K.D. UND BERGER, J.M. (2003) Structure of the topoisomerase VI-B subunit: implications for type II topoisomerase mechanism and evolution. *The EMBO Journal* 22: 151-163
- COLE, G.M., SCHILD, D. UND MORTIMER, R.K. (1989) Two DNA repair and recombination genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *RAD52* and *RAD54*, are induced during meiosis. *Molecular and Cellular Biology* 9: 3101-3104
- COUTEAU, F., BELZILE, F., HORLOW, C., GRANDJEAN, O., VEZON, D. UND DOUTRIAUX, M.P. (1999) Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of Arabidopsis. *The Plant Cell* 11: 1623-1634
- COUTEAU, F., NABESHIMA, K., VILLENEUVE, A. UND ZETKA, M. (2004) A component of *C. elegans* meiotic chromosome axes at the interface of homolog alignment, synapsis, nuclear reorganization, and recombination. *Current Biology* 14: 585-592
- CROMIE, G.A., HYPPA, R.W., TAYLOR, A.F., ZAKHARYEVICH, K., HUNTER, N. UND SMITH G.R. (2006) Single Holliday junctions are intermediates of meiotic recombination. *Cell* 127: 1167-1178
- CROFT, J.A. UND JONES, G.H. (1989) Meiosis in *Mesostoma ehrenbergii ehrenbergii*. IV. Recombination nodules in spermatocytes and a test of the correspondence of late recombination nodules and chiasmata. *Genetics* 121: 255-262

D

- DAVIES, A.A., MASSON, J.Y., MCILWRAITH, M.J., STASIAK, A.Z., STASIAK, A., VENKITARAMAN, A.R. UND WEST, S.C. (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Molecular Cell* 7: 273-282
- DAVIES, O.R., PELLEGRINI, L. (2007) Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nature Structural & Molecular Biology* 14: 475-483
- DE BOER, E. UND HEYTING, C. (2006) The diverse roles of transverse filaments of synaptonemal complexes in meiosis. *Chromosoma* 115: 220-234
- DERNBURG, A.F., McDONALD, K., MOULDER, G., BARSTEAD, R., DRESSER, M. UND VILLENEUVE, A.M. (1998) Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94: 387-398
- DIAZ, R.L., ALCID, A.D., BERGER, J.M. UND KEENEY, S. (2002) Identification of residues in yeast Spo11p critical for meiotic DNA double-strand break formation. *Molecular and Cellular Biology* 22: 1106-1115
- DIGWEED, M. (1993) Human genetic instability syndromes: single gene defects with increased risk of cancer. *Toxicology Letters* 67: 259-281
- DOMENICHINI, S., RAYNAUD, C., NI, D.A., HENRY, Y. UND BERGOUNIOUX, C. (2006) *Atmnd1-Δ1* is sensitive to gamma-irradiation and defective in meiotic DNA repair. *DNA Repair* 5: 455-464
- DOUTRIAUX, M.P., COUTEAU, F., BERGOUNIOUX, C. UND WHITE, C. (1998) Isolation and characterisation of the RAD51 and DMC1 homologs from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 257: 283-291
- DREWS, G.N., BOWMAN, J.L. UND MEYEROWITZ, E.M. (1991) Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* 65: 991-1002

E

- EGEL, R. (1975) Molekulare Aspekte der Meiose. *Biologie in unserer Zeit* 1: 11-17
- EIJPE, M., OFFENBERG, H., JESSBERGER, R., REVENKOVA, E. UND HEYTING, C. (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1 β and SMC3. *The Journal of Cell Biology* 160: 657-670

- ENGEL, W., ADHAM, I.M., NAYERNIA, K. UND NEESEN, J. (2004) Genetic causes of male infertility. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 88: 130-135
- ESASHI, F., GALKIN, V.E., YU, X., EGELMAN, E.H. UND WEST, S.C. (2007) Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nature Structural & Molecular Biology* 14(6): 468-474
- ESAU, K. (1977) *Anatomy of Seed Plants*. New York: John Wiley & Sons

F

- FAWCETT, D.W. (1956) The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophysic and Biochem Cytol* 2: 403-406
- FRANKLIN, A.E., MCELVER, J., SUNJEVARIC, I., ROTHSTEIN, R., BOWEN, B. UND CANDE, W.Z. (1999) Three-dimensional microscopy of the Rad51 recombination protein during meiotic prophase. *The Plant Cell* 11: 809-824
- FRANSZ, P., ARMSTRONG, S., ALONSO-BLANCO, C., FISCHER, T.C., TORRES-RUIZ, R.A. UND JONES, G.H. (1998) Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 13: 867-876
- FUNG, J.C., ROCKMILL, B., M. ODELL, M. UND ROEDER, G.S. (2004) Imposition of crossover interference through the nonrandom distribution of synapsis initiation complexes. *Cell* 116: 795-802

G

- GALKIN, V.E., ESASHI, F., YU, X., YANG, S., WEST, S.C. UND EGELMAN, E.H. (2005) BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102: 8537-8542.
- GANGLOFF, S., MCDONALD, J.P., BENDIXEN, C., ARTHUR, L. UND ROTHSTEIN, R. (1994) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Molecular and Cellular Biology* 14: 8391-8398
- GANGLOFF, S., DE MASSY, B., ARTHUR, L., ROTHSTEIN, R. UND FABRE, F. (1999) The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. *The EMBO Journal* 18: 1701-1711

- GARCIA, V., BRUCHET, H., CAMESCASSE, D., GRANIER, F., BOUCHEZ, D. UND TISSIER, A. (2003) *AtATM* is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *The Plant Cell* 15: 119-132
- GASIOR, S.L., WONG, A.K., KORA, Y., SHINOHARA, A. UND BISHOP, D.K. (1998) Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes & Development* 12: 2208-2221
- GERECKE, E.E. UND ZOLAN, M.E. (2000) An *mre11* mutant of *Coprinus cinereus* has defects in meiotic chromosome pairing, condensation and synapsis. *Genetics* 154: 1125-1139
- GERMAN, J. (1964) Cytological evidence for crossing-over in vitro in hyman lymphoid cells. *Science* 144: 298-301
- GERMAN, J., CRIPPA, L. P., UND BLOOM, D. (1974) Bloom's syndrome. 111. Analysis of the chromosome aberration characteristic of this disorder. *Chromosoma* 48: 361-366
- GERTON, J.L. UND DERISI, J.L. (2002) Mnd1p: an evolutionarily conserved protein required for meiotic recombination. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99: 6895-6900
- GILBERTSON, L.A. UND STAHL, F.W. (1994) Initiation of meiotic recombination is independent of interhomologue interactions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91: 11934-11937
- GILBERTSON, L.A. UND STAHL, F.W. (1996) A test of the double-strand break repair model for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144: 27-41
- GILLIES, C.B. (1985) An electron microscopic study of synaptonemal complex formation at zygotene in rye. *Chromosoma* 92: 165-175
- GOLDBERG, R.B., BEALS, T.P. UND SANDERS, P.M. (1993) Anther development: basic principles and practical applications. *The Plant Cell* 5: 1217-1229
- GOLUBOVSKAYA, I. N., AVALKINA, N. A. UND SHERIDAN, W. F. (1992) Effects of several meiotic mutations on female meiosis in maize. *Developmental Genetics* 13: 411-424
- GOLUBOVSKAYA, I.N., HAMANT, O., TIMOFEJEVA, L., WANG, C.J., BRAUN, D., MEELEY, R. UND CANDE, W.Z. (2006) Alleles of *afd1* dissect REC8 functions during meiotic prophase I. *Journal of Cell Science* 119: 3306-3315
- GORBUNOVA, V. UND LEVY, A.A. (1997) Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic Acids Research* 25: 4650-4657

- GOWEN, L.C., JOHNSON, B.L., LATOUR, A.M., SULIK, K.K. UND KOLLER, B.H. (1996) *Brc1* deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nature Genetics* 12: 191-194
- GRELON, M., VEZON, D., GENDROT, G. UND PELLETIER, G. (2001) *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *The EMBO Journal* 20: 589-600
- GROSSNIKLAUS, U. UND SCHNEITZ, K. (1998) The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9: 227-238
- GRUBER, S., HAERING, C.H. UND NASMYTH, K. (2003) Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* 112: 765-777
- GUILLON, H., BAUDAT, F., GREY, C., LISKAY, R.M. UND DE MASSY, B. (2005) Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Molecular Cell* 20: 563-573

H

- HALL, J.M., LEE, M.K., NEWMAN, B., MORROW, J.E., ANDERSON, L.A., HUEY, B. UND KING, M.C. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250: 1684-1689
- HAMANT, O., MA, H. UND CANDE, W.Z. (2006) Genetics of meiotic prophase I in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 267-302
- HARTUNG, F., ANGELIS, K.J., MEISTER, A., SCHUBERT, I., MELZER, M. UND PUCHTA, H. (2002) An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Current Biology* 12: 1787-1791
- HARTUNG, F., PLCHOVÁ, H. UND PUCHTA, H. (2000) Molecular characterisation of RecQ homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 28: 4275-4282
- HARTUNG, F. UND PUCHTA, H. (2000) Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 28: 1548-1554
- HARTUNG, F. UND 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. UND PUCHTA, H. (2006) The RecQ gene family in plants. *Journal of Plant Physiology* 163: 287-296

- HARTUNG, F., WURZ-WILDERSINN, R., FUCHS, J., SCHUBERT, I., SUER, S. UND PUCHTA, H. (2007a) The catalytically active tyrosine residues of both AtSPO11-1 and AtSPO11-2 are required for meiotic DSB induction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 1-10
- HARTUNG, F., SUER, S. UND PUCHTA, H. (2007b) Two closely related RecQ-helicases have antagonistic roles in homologous recombination and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, im Druck
- HASENKAMPF, C.A. (1984) Synaptonemal complex formation in pollen mother cells of *Tradescantia*. *Chromosoma* 90: 275-284
- HATANAKA, A., YAMAZOE, M., SALE, J.E., TAKATA, M., YAMAMOTO, K., KITAO, H., SONODA, E., KIKUCHI, K., YONETANI, Y. UND TAKEDA, S. (2005) Similar effects of Brca2 truncation and Rad51 paralog deficiency on immunoglobulin V gene diversification in DT40 cells support an early role for Rad51 paralogs in homologous recombination. *Molecular and Cellular Biology* 25: 1124-1134
- HEMPEL, F.D., ZAMBRYSKI, P.C. UND FELDMAN, L.J. (1998) Photoinduction of flower identity in vegetatively biased primordia. *The Plant Cell* 10: 1663-1676
- HENDERSON, K.A. UND KEENEY, S. (2004) Tying synaptonemal complex initiation to the formation and programmed repair of DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101: 4519-4524
- HENRY, J.M., CAMAHORT, R., RICE, D.A., FLORENS, L., SWANSON, S.K., WASHBURN, M.P. UND GERTON, J.L. (2006) Mnd1/Hop2 facilitates Dmc1-dependent interhomolog crossover formation in meiosis of budding yeast. *Molecular and Cellular Biology* 26: 2913-2923
- HESLOP-HARRISON, J. (1963) Ultrastructural aspects of differentiation in sporogenous tissue. In: *Symposium of the Society for Experimental Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 315-340.
- HESLOP-HARRISON, J. (1966a) Cytoplasmic connexions between angiosperm meiocytes. *Annals of Botany* 30: 221-230.
- HESLOP-HARRISON, J. (1966b) Cytoplasmic continuities during spore formation in flowering plants. *Endeavour* 25: 65-72.
- HEYER, W.D. (2004) Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation. *Current Biology* 14: R56-R58
- HEYER, W.D., EHMSSEN, K.T. UND SOLINGER, J.A. (2003) Holliday junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight? *Trends in Biochemical Sciences* 28: 548-557

- HEYTING, C. (1996) Synaptonemal complexes: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* 8: 389-396
- HICKSON, I.D. (2003) RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nature Reviews Cancer* 3: 169-178
- HIGGINS, J.D., ARMSTRONG, S.J., FRANKLIN, F.C. UND JONES, G.H. (2004) The *Arabidopsis MutS* homolog *AtMSH4* functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 18: 2557-2570
- HILL, J.P. UND LORD, E.M. (1989) Floral development in *Arabidopsis thaliana*: a comparison of the wild-type and the homeotic *pistillata* mutant. *Canadian Journal of Botany* 67: 2922–2936
- HOLLINGSWORTH, N.M., PONTE, L. UND HALSEY, C. (1995) *MSH5*, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes & Development* 9: 1728-1739
- HOLM, P.B. (1986) Ultrastructural analysis of meiotic recombination and chiasma formation. *Tokai Journal of Experimental & Clinical Medicine* 11: 415-436
- HOLM, P. B. (1977) Three dimensional reconstruction of chromosome pairing during the zygotene stage of meiosis in *Lilium longijorum* (Thumb.). *Carlsberg Research Communications* 42: 249-281
- HOLM, P.B., RASMUSSEN, S.W. UND VON WETTSTEIN, D. (1982) Ultrastructural characterization of the meiotic prophase. A tool in the assessment of radiation damage in man. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 95: 45-59
- HOPE, J.C., MENSE, S.M., JALAKAS, M., MITSUMOTO, J. UND FREYER, G.A. (2006) Rqh1 blocks recombination between sister chromatids during double strand break repair, independent of its helicase activity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103: 5875-5880
- HORVITZ, H.R. UND HERSKOWITZ, I. (1992) Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 68: 237-255
- HORWITZ, A.A., AFFAR EL, B., HEINE, G.F., SHI, Y. UND PARVIN, J.D. (2007) A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 104: 6614-6619
- HOWDEN, R., PARK, S.K., MOORE, J.M., ORME, J., GROSSNIKLAUS, U. UND TWELL, D. (1998) Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis*. *Genetics* 149: 621-631

- HU, P., BERESTEN, S.F., VAN BRABANT, A.J., YE, T.Z., PANDOLCI, P.P., JOHNSON, F.B., GUARENTE, L., UND ELLIS, N.A. (2001) Evidence for BLM and Topoisomerase III α interaction in genomic stability. *Human Molecular Genetics* 10: 1287-1298
- HUALA, E. UND SUSSEX, I.M. (1992) *LEAFY* interacts with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development. *The Plant Cell* 4: 901-913
- HUNTER, N. (2007) Meiotic recombination. In Homologous Rekombination, eds. Aguilera, A. und Rothstein, R., Springer, Heidelberg
- HUNTER, H. UND KLECKNER, N. (2001) The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-Holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* 106: 59-70
- HUSSAIN, S., WILSON, J.B., MEDHURST, A.L., HEJNA, J., WITT, E., ANANTH, S., DAVIES, A., MASSON, J.Y., MOSES, R., WEST, S.C., DE WINTER, J.P., ASHWORTH, A., JONES, N.J. UND MATHEW, C.G. (2004) Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Human Molecular Genetics* 13: 1241-1248

I

- IKEYA, T., SHINOHARA, A., SATO, S., TABATA, S. UND OGAWA, T. (1996) Localization of mouse Rad51 and Lim15 proteins on meiotic chromosomes at late stages of prophase 1. *Genes to Cells* 1: 379-389
- IRA, G., MALKOVA, A., LIBERI, G., FOIANI, M. UND HABER, J.E. (2003) Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* 115: 401-411
- ITO, M. UND TAKEGAMI, M.H. (1982) Commitment of meiotic cells to meiosis during the G2 phase of premeiosis. *Plant & Cell Physiology* 23: 943-952

J

- JAEGER, K.E. UND WIGGE, P.A. (2007) FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Current Biology* 17: 1050-1054
- JENIK, P.D. UND IRISH, V.F. (2000) Regulation of cell proliferation patterns by homeotic genes during *Arabidopsis* floral development. *Development* 127: 1267-1276

- JENIK, P.D. UND IRISH, V.F. (2001) The *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3* differentially regulates intercellular signaling required for petal and stamen development. *Development* 128: 13-23
- JESSOP, L., ALLERS, T. UND LICHTEN, M. (2005) Infrequent co-conversion of markers flanking a meiotic recombination initiation site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 169: 1353-1367
- JIAO, K., SALEMM L, UND MALONE, R. (2003) Support for a meiotic recombination initiation complex: interactions among Rec102p, Rec104p, and Spo11p. *Molecular and Cellular Biology* 23: 5928-5938
- JIN, Y., UZAWA, S. UND CANDE, W.Z. (2002) Fission yeast mutants affecting telomere clustering and meiosis-specific spindle pole body integrity. *Genetics* 160: 861-876
- JIN, Y., XU, X.L., YANG, M.C., WEI, F., AYI, T.C., BOWCOCK, A.M. UND BAER, R. (1997) Cell cycle-dependent colocalization of BARD1 and BRCA1 proteins in discrete nuclear domains. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94: 12075-12080
- JOHN, B. (1990) Meiosis. Cambridge University Press, Developmental and Cell Biology, Serie 22

K

- KALIRAMAN, V., MULLEN, J.R., FRICKE, W.M., BASTIN-SHANOWER, S.A. UND BRILL, S.J. (2001) Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes & Development* 15: 2730-2740
- KANAAR, R., TROELSTRA, C., SWAGEMAKERS, S.M., ESSERS, J., SMIT, B., FRANSEN, J.H., PASTINK, A., BEZZUBOVA, O.Y., BUERSTEDDE, J.M., CLEVER, B., HEYER, W.D. UND HOEIJMAKERS, J.H. (1996) Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* *RAD54* DNA repair gene: evidence for functional conservation. *Current Biology*. 6: 828-838
- KAROW, J.K., CONSTANTINOU, A., LI, J.L., WEST, S.C. UND HICKSON, I.D. (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 97: 6504-6508
- KATAGIRI, T., SAITO, H., SHINOHARA, A., OGAWA, H., KAMADA, N., NAKAMURA, Y. UND MIKI, Y. (1998) Multiple possible sites of BRCA2 interacting with DNA repair protein RAD51. *Genes, Chromosomes and Cancer* 21: 217-222

- KEE, K. UND KEENEY, S. (2002) Functional interactions between *SPO11* and *REC102* during initiation of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 160: 111-122
- KEEGAN, K.S., HOLTZMAN, D.A., PLUG, A.W., CHRISTENSON, E.R., BRAINERD, E.E., FLAGGS, G., BENTLEY, N.J., TAYLOR, E.M., MEYN, M.S., MOSS, S.B., CARR, A.M., ASHLEY, T. UND HOEKSTRA, M.F. (1996) The *Atr* and *Atm* protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes & Development* 10: 2423-2437
- KEENEY, S. (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Current Topics in Developmental Biology* 52: 1-53
- KEENEY, S., GIROUX, C.N. UND 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
- KEMPIN, S.A., SAVIDGE, B. UND YANOFSKY, M.F. (1995) Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science* 267: 522-525
- KERZENDORFER, C., VIGNARD, J., PEDROSA-HARAND, A., SIWIEC, T., AKIMCHEVA, S., JOLIVET, S., SABLONSKI, R., ARMSTRONG, S., SCHWEIZER, D., MERCIER, R. UND SCHLÖGELHOFER, P. (2006) The *Arabidopsis thaliana* *MND1* homologue plays a key role in meiotic homologous pairing, synapsis and recombination. *Journal of Cell Science* 19: 2486-2496
- KITAO, H., YAMAMOTO, K., MATSUSHITA, N., OHZEKI, M., ISHIAI, M. UND TAKATA, M. (2006) Functional interplay between BRCA2/FancD1 and FancC in DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 21312-21320
- KLECKNER, N., ZICKLER, D., JONES, G.H., DEKKER, J., PADMORE, R., HENLE, J. UND HUTCHINSON, J. (2004) A mechanical basis for chromosome function. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101: 12592-12597
- KLEIN, H.L. (1997) RDH54, a *RAD54* homologue in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for mitotic diploid-specific recombination and repair and for meiosis. *Genetics* 147: 1533-1543
- KLEIN, F., MAHR, P., GALOVA, M., BUONOMO, S.B., MICHAELIS, C., NAIRZ, K. UND NASMYTH, K. (1999) A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98: 91-103
- KNOTT, J.E. (1934). Effect of localized photoperiod on spinach. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 31: 152-154
- KOJIC, M., KOSTRUB, C.F., BUCHMAN, A.R. UND HOLLOMAN, W.K. (2002) BRCA2 homolog required for proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Molecular Cell* 10: 683-691

- KOMEDA, Y. (2004) Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* 55: 521-535
- KOORNNEEF, M., HANHART, C.J. UND VAN DER VEEN, J.H. (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 229: 57-66
- KOWALCZYKOWSKI, S.C. (2002) Molecular mimicry connects BRCA2 to Rad51 and recombinational DNA repair. *Nature Structural Biology* 9: 897-899
- KRIZEK, B.A. UND FLETCHER, J.C. (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics* 6: 688-698
- KUZNETSOV, S., PELLEGRINI, M., SHUDA, K., FERNANDEZ-CAPETILLO, O., LIU, Y., MARTIN, B.K., BURKETT, S., SOUTHON, E., PATI, D., TESSAROLLO, L., WEST, S.C., DONOVAN, P.J., NUSSENZWEIG, A. UND SHARAN, S.K. (2007) RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. *The Journal of Cell Biology* 176: 581-592
- KWAN, K.Y., MOENS, P.B. UND WANG, J.C. (2003) Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III β . *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 100: 2526-2531
- KWAN, K. Y. UND WANG, J. C. (2001) Mice lacking DNA topoisomerase III β develop to maturity but show a reduced mean lifespan. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98: 5717-5721

L

- LALANNE, E. UND TWELL, D. (2002) Genetic control of male germ unit organization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 865-875
- LAMB RS, HILL TA, TAN QK, IRISH VF. (2002) Regulation of *APETALA3* floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* 129: 2079-2086
- LI, W., CHEN, C., MARKMANN-MULISCH, U., TIMOFEJEVA, L., SCHMELZER, E., MA, H. UND REISS, B. (2004) The *Arabidopsis AtRAD51* gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101: 10596-10601

- LI, J., HARPER, L.C., GOLUBOVSKAYA, I., WANG, C.R., WEBER, D., MEELEY, R.B., MCELVER, J., BOWEN, B., CANDE, W.Z. UND SCHNABLE, P.S. (2007) Functional analysis of maize RAD51 in meiosis and double-strand break repair. *Genetics* 176: 1469-1482
- LI, W. UND WANG, J.C. (1998) Mammalian DNA topoisomerase III α is essential in early embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95: 1010-1013
- LI, W., YANG, X., LIN, Z., TIMOFEJEVA, L., XIAO, R., MAKAROFF, C.A. UND MA, H. (2005) The AtRAD51C gene is required for normal meiotic chromosome synapsis and double-stranded break repair in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 965-976
- LI, Z., GOLUB, E.I., GUPTA, R. UND RADDING, C.M. (1997) Recombination activities of HsDmc1 protein, the meiotic human homolog of RecA protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94: 11221-11226
- LICHTEN, M. (2001) Meiotic recombination: breaking the genome to save it. *Current Biology* 11: R253-R256
- LILJEGREN, S.J., GUSTAFSON-BROWN, C., PINYOPICH, A., DITTA, G.S., UND YANOFSKY, M.F. (1999) Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *The Plant Cell* 11: 1007-1018
- LIU, Y., TARSOUNAS, M., O'REGAN, P. UND WEST, S.C. (2007) Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 1973-1979
- LOIDL, J. (1990) The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* 33: 759-787
- LU, B.C. (1993) Spreading the synaptonemal complex of *Neurospora crassa*. *Chromosoma* 102: 464-472
- LUDWIG, T., CHAPMAN, D.L., PAPAIOANNOU, V.E. UND EFSTRATIADIS, A. (1997) Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of *Brca1*, *Brca2*, *Brca1/Brca2*, *Brca1/p53*, and *Brca2/p53* nullizygous embryos. *Genes & Development* 11: 1226-1241
- LÜTTGE, U., KLUGE, M. UND BAUER, G. (2005) Botanik. 5. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim
- LYNN, A., SOUCEK, R. UND BÖRNER, G.V. (2007) ZMM proteins during meiosis: crossover artists at work. *Chromosome Research* 15: 591-605

M

- MA, H. (2005) Molecular genetic analysis of microsporogenesis and microgametogenesis. *Annual Review of Plant Biology* 56 : 393-434
- MACQUEEN, A.J., PHILLIPS, C.M., BHALLA, N., WEISER, P., VILLENEUVE, A.M. UND DERNBURG, A.F. (2005) Chromosome sites play dual roles to establish homologous synapsis during meiosis in *C. elegans*. *Cell* 123: 1037-1050
- MAHADEVAIAH, S.K., TURNER, J.M.A., BAUDAT, F., ROGAKOU, E.P., DE BOER, P., BLANCO-RODRÍGUEZ, J., JASIN, M., KEENEY, S., BONNER, W.M. UND BURGOYNE, P.S. (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature Genetics* 27: 271-276
- MAHESHWARI, P. (1950) An Introduction to the Embryology of Angiosperms. McGraw-Hill, New York, USA, pp. 453
- MALCOMBER, S.T. UND KELLOGG, E.A. (2005) *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls. *Trends in Plant Science* 10: 427-435
- MALLERY, D.L., VANDENBERG, C.J. UND HIOM, K. (2002) Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *The EMBO Journal* 21: 6755-6762
- MALUSZYNSKA, J. UND HESLOP-HARRISON, J.S. (1991) Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 1: 159-166
- MANDEL, M.A. UND YANOFSKY, M.F. (1995) A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377: 522-524
- MANKOURI, H.W. UND HICKSON, I.D. (2004) Understanding the roles of RecQ helicases in the maintenance of genome integrity and suppression of tumorigenesis. *Biochemical Society Transactions* 32: 957-958
- MARTIN, J.S., WINKELMANN, N., PETALCORIN, M.I., MCILWRAITH, M.J. UND BOULTON, S.J. (2005) RAD-51-dependent and -independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* 25: 3127-3139
- MARTÍNEZ-PÉREZ, E., SHAW, P., READER, S., ARAGÓN-ALCAIDE, L., MILLER, T. UND MOORE, G. (1999) Homologous chromosome pairing in wheat. *Journal of Cell Science* 112: 1761-1769
- MARTINEZ-PEREZ, E. UND VILLENEUVE, A.M. (2005) HTP-1-dependent constraints coordinate homolog pairing and synapsis and promote chiasma formation during *C. elegans* meiosis. *Genes & Development* 9: 2727-2743

- MASCARENHAS, J.P. (1975) The biochemistry of angiosperm pollen development. *Botanical Review* 41: 259-314
- MAZINA, O.M., MAZIN, A.V., NAKAGAWA, T., KOLODNER, R.D. UND KOWALCZYKOWSKI, S.C. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 helicase stimulates 3'-5' heteroduplex extension by Rad51; implications for crossover control in meiotic recombination. *Cell* 117: 47-56
- MCCLINTOCK, B. (1933) The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 19: 191-237
- MCKIM, K.S., GREEN-MARROQUIN, B.L., SEKELSKY, J.J., CHIN, G., STEINBERG, C., KHODOSH, R. UND HAWLEY, R.S. (1998) Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279: 876-878
- MCCORMICK, S. (1993) Male gametophyte development. *The Plant Cell* 5: 1265-1275
- MERCIER, R., ARMSTRONG, S.J., HORLOW, C., JACKSON, N.P., MAKAROFF, C.A., VEZON, D., PELLETIER, G., JONES, G.H. UND FRANKLIN, F.C. (2003) The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis*. *Development* 130: 3309-3318
- MICHAELIS, C., CIOSK, R. UND NASMYTH, K. (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91: 35-45
- MILUTINOVICH, M., UNAL, E., WARD, C., SKIBBENS, R.V. UND KOSHLAND, D. (2007) A multi-step pathway for the establishment of sister chromatid cohesion. *PLoS Genetics* 3: e12
- MIN, J., PARK, P.G., KO, E., CHOI, E. UND LEE, H. (2007) Identification of Rad51 regulation by BRCA2 using *Caenorhabditis elegans* BRCA2 and bimolecular fluorescence complementation analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362: 958-964
- MLADENOV, E., TSANEVA, I. UND ANACHKOVA, B. (2007) Activation of the S phase DNA damage checkpoint by mitomycin C. *Journal of Cellular Physiology* 211: 468-476
- MODRUSAN, Z., REISER, L., FELDMANN, K.A., FISCHER, R.L. UND HAUGHN, G.W. (1994) Homeotic transformation of ovules into carpel-like structures in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 6: 333-349
- MOENS, P.B. (1973) Mechanisms of chromosome synapsis at meiotic prophase. *International Review of Cytology* 35: 117-134
- MOENS, P.B., PEARLMAN, R.E., HENG, H.H. UND TRAUT, W. (1998) Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase. *Current Topics in Developmental Biology* 37: 241-262
- MOENS, P.B. UND PEARLMAN, R.E. (1988) Chromatin organization at meiosis. *Bioessays* 9:

151-153

- MOENS, P.B., TAROUNAS, M., MORITA, T., HABU, T., ROTTINGHAUS, S.T., FREIRE, R., JACKSON, S.P., BARLOW, C. UND WYNHAW-BORIS, A. (1999) The association of ATR protein with mouse meiotic chromosome cores. *Chromosoma* 108: 95-102
- MOLNAR, M., BÄHLER, J., SIPICZKI, M. UND KOHLI, J. (1995) The *rec8* gene of *Schizosaccharomyces pombe* is involved in linear element formation, chromosome pairing and sister-chromatid cohesion during meiosis. *Genetics* 141: 61-73
- MOLNAR, M., DOLL, E., YAMAMOTO, A., HIRAOKA, Y. UND KOHLI, J. (2003) Linear element formation and their role in meiotic sister chromatid cohesion and chromosome pairing. *Journal of Cell Science* 116: 1719-1731
- MOORE, D.P. UND ORR-WEAVER, T.L. (1998) Chromosome segregation during meiosis: building an unambivalent bivalent. *Current Topics in Developmental Biology* 37: 263-299
- MOSES, M.J. (1956) Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2: 215-218
- MOSES, M.J. (1969) Structure and function of the synaptonemal complex. *Genetics* 61: 41-51
- MOYNAHAN, M.E., CHIU, J.W., KOLLER, B.H. UND JASIN, M. (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Molecular Cell* 4: 511-518
- MOYNAHAN, M.E., PIERCE, A.J. UND JASIN, M. (2001) BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Molecular Cell* 7: 263-272
- MULLEN, J.R., NALLASETH, F.S., LAN, Y.Q., SLAGLE, C.E. UND BRILL, S.J. (2005) Yeast Rmi1/Nce4 controls genome stability as a subunit of the Sgs1-Top3 complex. *Molecular and Cellular Biology* 25: 4476-4487
- MÜLLER, A. (1961) Zur Charakterisierung der Blüten und Infloreszenzen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Kulturpflanze* 9, 364-393
- MURIS, D.F., VREEKEN, K., SCHMIDT, H., OSTERMANN, K., CLEVER, B., LOHMAN, P.H. UND PASTINK, A. (1997) Homologous recombination in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: different requirements for the *rhp51+*, *rhp54+* and *rad22+* genes. *Current Genetics* 31: 248-254

N

- NAKAGAWA, T. UND OGAWA, H. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* *MER3* gene, encoding a novel helicase-like protein, is required for crossover control in meiosis. *The EMBO Journal* 18: 5714-5723
- NAKANISHI, K., YANG, Y.G., PIERCE, A.J., TANIGUCHI, T., DIGWEED, M., D'ANDREA, A.D., WANG, Z.Q. UND JASIN, M. (2005) Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102: 1110-1115
- NASMYTH, K. (2002) Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297: 559-565
- NEALE, M.J., RAMACHANDRAN, M., TRELLES-STICKEN, E., SCHERTHAN, H. UND GOLDMAN, A.S.H. (2002) Wild-type levels of Spo11-induced DSBs are required for normal single-strand resection during meiosis. *Molecular Cell* 9: 835-846
- NEALE, M.J., PAN, J. UND KEENEY, S. (2005) Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* 436: 1053-1057
- NICHOLS, M.D., DEANGELIS, K., KECK, J.L. UND BERGER, J.M. (1999) Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *The EMBO Journal* 18: 6177-6188
- NOGUCHI, J. (2002) Homolog pairing and two kinds of bouquets in the meiotic prophase of rye, *Secale cereale*. *Genes & Genetic Systems* 77: 39-50
- NOVAK, J.E., ROSS-MACDONALD, P.B. UND ROEDER, G.S. (2001) The budding yeast Msh4 protein functions in chromosome synapsis and the regulation of crossover distribution. *Genetics* 158: 1013-1025

O

- OAKLEY, T.J., GOODWIN, A., CHAKRAVERTY, R.K. UND HICKSON, I.D. (2002) Inactivation of homologous recombination suppresses defects in topoisomerase III-deficient mutants. *DNA Repair* 1: 463-482
- OH, M., CHOI, I.S. UND PARK, S.D. (2002) Topoisomerase III is required for accurate DNA replication and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research* 30: 4022-4031

- OKADA, K., KOMAKI, M.K. UND SHIMURA, Y. (1989) Mutational analysis of pistil structure and development of *Arabidopsis thaliana*. *Cell Differentiation and Development* 28: 27-37
- OKAMURO, J.K., DEN BOER, B.G.W. UND JOFUKU, K.D. (1993) Regulation of *Arabidopsis* flower development. *The Plant Cell* 5: 1183-1193
- OREL, N., KYRYK, A. UND PUCHTA, H. (2003) Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *The Plant Journal* 35: 604-612
- OSAKABE, K., ABE, K., YAMANOUCHI, H., TAKYUU, T., YOSHIOKA, T., ITO, Y., KATO, T., TABATA, S., KUREI, S., YOSHIOKA, Y., MACHIDA, Y., SEKI, M., KOBAYASHI, M., SHINOZAKI, K., ICHIKAWA, H., AND TOKI, S. (2005). *Arabidopsis* Rad51B is important for double-strand DNA breaks repair in somatic cells. *Plant Molecular Biology* 57: 819-833

P

- PADMORE, R., CAO, L. UND KLECKNER, N. (1991) Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 66: 1239-1256
- PAGE, S.L. UND HAWLEY, R.S. (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301: 785-789
- PAGE, S.L. UND HAWLEY, R.S. (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 525-558
- PALOM, Y., SURESH KUMAR, G., TANG, L.Q., PAZ, M.M., MUSSER, S.M., ROCKWELL, S. UND TOMASZ, M. (2002) Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C. *Chemical Research in Toxicology* 15: 1398-1406
- PANOLI, A.P., RAVI, M., SEBASTIAN, J., NISHAL, B., REDDY, T.V., MARIMUTHU, M.P., SUBBIAH, V., VIJAYBHASKAR, V. UND SIDDIQI, I. (2006) *AtMND1* is required for homologous pairing during meiosis in *Arabidopsis*. *BMC Molecular Biology* 7: 24
- PÂQUES, F. UND HABER, J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 349-404
- PARISI, S., MCKAY, M.J., MOLNAR, M., THOMPSON, M.A., VAN DER SPEK, P.J., VAN DRUNEN-SCHOENMAKER, E., KANAAR, R., LEHMANN, E., HOEIJMAKERS, J.H. UND KOHLI, J. (1999) Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the

- Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Molecular and Cellular Biology* 19: 3515-3528
- PAULL, T.T., CORTEZ, D., BOWERS, B., ELLEDGE, S.J. UND GELLERT, M. (2001) Direct DNA binding by Brca1. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98: 6086-6091
- PAWLOWSKI, W.P. UND CANDE, W.Z. (2005) Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends in Cell Biology* 15: 674-581
- PAWLOWSKI, W.P., GOLUBOVSKAYA, I.N., UND CANDE, W.Z. (2003) Altered nuclear distribution of recombination protein RAD51 in maize mutants suggests the involvement of RAD51 in meiotic homology recognition. *The Plant Cell* 15: 1807-1816
- PAWLOWSKI, W.P., GOLUBOVSKAYA, I.N., TIMOFEJEVA, L., MEELEY, R.B., SHERIDAN, W.F. UND CANDE, W.Z. (2004) Coordination of meiotic recombination, pairing, and synapsis by PHS1. *Science* 303: 89-92
- PAWLOWSKI, W.P., SHEEHAN, M.J. UND RONCERET, A. (2007) In the beginning: the initiation of meiosis. *Bioessays* 29: 511-514
- PELAZ, S., DITTA, G.S., BAUMANN, E., WISMAN, E. UND YANOFSKY, M.F. (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405: 200-203
- PELLEGRINI, L., YU, D.S., LO, T., ANAND, S., LEE, M., BLUNDELL, T.L., VENKITARAMAN, A.R. (2002) Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 420: 287-293
- PEOPLES-HOLST, T.L. UND BURGESS, S.M. (2005) Multiple branches of the meiotic recombination pathway contribute independently to homolog pairing and stable juxtaposition during meiosis in budding yeast. *Genes & Development* 19: 863-874
- PETUKHOVA, G.V., PEZZA, R.J., VANEVSKI, F., PLOQUIN, M., MASSON, J.Y. UND CAMERINI-OTERO, R.D. (2005) The Hop2 and Mnd1 proteins act in concert with Rad51 and Dmc1 in meiotic recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* 12: 449-453
- PETUKHOVA, G.V., ROMANIENKO, P.J. UND CAMERINI-OTERO, R.D. (2003) The Hop2 protein has a direct role in promoting interhomolog interactions during mouse meiosis. *Developmental Cell* 5: 927-936
- PEZZA, R.J., PETUKHOVA, G.V., GHIRLANDO, R. UND CAMERINI-OTERO, R.D. (2006) Molecular activities of meiosis-specific proteins Hop2, Mnd1, and the Hop2-Mnd1 complex. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 18426-18434

- PFEIFER, C., THOMSEN, P.D. UND SCHERTHAN, H. (2001) Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis. *Cytogenetics and Cell Genetics* 93: 304-314
- PITTMAN, D.L., COBB, J., SCHIMENTI, K.J., WILSON, L.A., COOPER, D.M., BRIGNULL, E., HANDEL, M.A. und Schimenti, J.C. (1998) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmc1*, a germline-specific RecA homolog. *Molecular Cell* 1: 697-705
- PLANK, J.L., WU, J. UND HSIEH, T.S. (2006) Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103: 11118-11123
- PLOQUIN, M., PETUKHOVA, G.V., MORNEAU, D., DÉRY, U., BRANSI, A., STASIAK, A., CAMERINI-OTERO, R.D. UND MASSON, J.Y. (2007) Stimulation of fission yeast and mouse Hop2-Mnd1 of the Dmc1 and Rad51 recombinases. *Nucleic Acids Research* 35: 2719-2733
- PLUG, A.W., PETERS, A.H., XU, Y., KEEGAN, K.S., HOEKSTRA, M.F., BALTIMORE, D., DE BOER, P. UND ASHLEY, T. (1997) ATM and RPA in meiotic chromosome synapsis and recombination. *Nature Genetics* 17: 457-461
- PLUG, A.W., XU, J., REDDY, G., GOLUB, E.I. UND ASHLEY, T. (1996) Presynaptic association of Rad51 protein with selected sites in meiotic chromatin. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93: 5920-5924
- PRIELER, S., PENKNER, A., BORDE, V. UND KLEIN, F. (2005) The control of Spo11's interaction with meiotic recombination hotspots. *Genes & Development* 19: 255-269
- PUCHTA, H. (1999a) Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics* 152: 1173-1181
- PUCHTA, H. (1999b) Doppelstrangbruchreparatur und Genomevolution bei Pflanzen. *Biospektrum* 2: 105-108
- PUCHTA, H., DUJON, B. UND HOHN, B. (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93: 5055-5060
- PUCHTA, H. UND HOHN, B. (1996) From centimorgans to basepairs: Homologous recombination in plants. *Trends in Plant Science* 1: 340-348
- PUIZINA, J., SIROKY, J., MOKROS, P., SCHWEIZER, D. UND RIHA, K. (2004) Mre11 deficiency in Arabidopsis is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *The Plant Cell* 16: 1968-1978

PUKKILA, P.J. UND LU, B.C. (1985) Silver staining of meiotic chromosomes in the fungus, *Coprinus cinereus*. *Chromosoma* 91: 108-112

R

RAHMAN, N. UND STRATTON, M.R. (1998) The genetics of breast cancer susceptibility. *Annual Review of Genetics* 32: 95-121

RASMUSSEN, S.W. (1977) Meiosis in *Bombyx mori* females. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Science* 277: 343-350

RASMUSSEN, S.W., HOLM, P.B., LU, B.C., ZICKLER, D. UND SAGE, J. (1981) Synaptonemal complex formation and distribution of recombination nodules in pachytene trivalents of triploid *Coprinus cinereus*. *Carlsberg Research Communications* 46: 347-360

RAYNARD, S., BUSSEN, W. UND SUNG, P. (2006) A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase III α , and BLAP75. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 13861-13864

REGAN, S.M. UND MOFFAT, B.A. (1990) Cytochemical analysis of pollen development in wild-type *Arabidopsis* and a male-sterile mutant. *The Plant Cell* 2: 877-889

REIDT, W., WURZ, R., WANIECK, K., CHU, H.H. UND PUCHTA, H. (2006) A homologue of the breast cancer-associated gene BARD1 is involved in DNA repair in plants. *The EMBO Journal* 25: 4326-4337

REISER, L. UND FISCHER, R.L. (1993) The ovule and the embryo sac. *The Plant Cell* 5: 1291-1301

REVENKOVA, E., EIJPE, M., HEYTING, C., HODGES, C.A., HUNT, P.A., LIEBE, B., SCHERTHAN, H. UND JESSBERGER, R. (2004) Cohesin SMC1 β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nature Cell Biology* 6: 555-562

ROBINSON-BEERS, K., PRUITT, R.E. UND GASSER, C.S. (1992) Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *The Plant Cell* 4: 1237-1249

ROBLES, P. UND PELAZ, S. (2005) Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *The International Journal of Developmental Biology* 49: 633-643

ROCKMILL, B., SYM, M., SHERTHAN, H. UND ROEDER, G.S. (1995) Roles for two RecA homologs in promoting meiotic chromosome synapsis. *Genes & Development* 9: 2684-2695

RAO, V.A., FAN, A.M., MENG, L., DOE, C.F., NORTH, P.S., HICKSON, I.D. UND POMMIER, Y. (2005) Phosphorylation of BLM, dissociation from topoisomerase III α , and colocalization

- with γ -H2AX after topoisomerase I-induced replication damage. *Molecular and Cellular Biology* 25: 8925-8937
- ROEDER, G.S. (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & Development* 11: 2600-2621
- ROMANIENKO, P.J. UND CAMERINI-OTERO, R.D. (2000) The mouse *Spo11* gene is required for meiotic synapsis. *Molecular Cell* 6: 975-987
- ROSS, K.J., FRANZ, P. UND JONES, G.H. (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research* 4: 507-516
- RUFFNER, H. UND VERMA, I.M. (1997) BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94: 7138-7143
- S**
- SABLOWSKI, R. (2007) Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 58: 899-907
- SAEKI H, SIAUD N, CHRIST N, WIEGANT WW, VAN BUUL PP, HAN M, ZDZIENICKA MZ, STARK JM, JASIN M. (2006) Suppression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103: 8768-8773
- SANCHEZ-MORAN, E., SANTOS, J.L., JONES, G.H. UND FRANKLIN, F.C. (2007) ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 21: 2220-2233
- SCHERTHAN, H. (2001) A bouquet makes ends meet. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 621-627
- SCHERTHAN, H., WEICH, S., SCHWEGLER, H., HEYTING, C., HÄRLE, M. UND CREMER, T. (1996) Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *The Journal of Cell Biology* 134: 1109-1125
- SCHMEKEL, K., SKOGLUND, U. UND DANEHOLT, B. (1993a) The three-dimensional structure of the central region in a synaptonemal complex: a comparison between rat and two insect species, *Drosophila melanogaster* and *Blaps cribrosa*. *Chromosoma* 102: 682-692

- SCHMEKEL, K., WAHRMAN, J., SKOGLUND, U. UND DANEHOLT, B. (1993b) The central region of the synaptonemal complex in *Blaps cribrosa* studied by electron microscope tomography. *Chromosoma* 102: 669-681
- SCHMUCKLI-MAURER, J. UND HEYER, W.D. (2000) Meiotic recombination in RAD54 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 109: 86-93
- SCHNEITZ, K., HÜLSKAMP, M. AND PRUITT, R.E. (1995). Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount ovules. *The Plant Journal* 7: 731-749
- SCHWACHA, A. UND KLECKNER, N. (1994) Identification of joint molecules that form frequently between homologs but rarely between sister chromatids during yeast meiosis. *Cell* 76: 51-63
- SCHWACHA, A. UND KLECKNER, N. (1995) Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell* 83: 783-791
- SCHWACHA, A. UND KLECKNER, N. (1997) Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* 90: 1123-1135
- SCHWARZACHER, T. (2003) Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent *in situ* hybridization data in plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 11-23
- SEHORN, M.G., SIGURDSSON, S., BUSSEN, W., UNGER, V.M. UND SUNG, P. (2004) Human meiotic recombinase Dmc1 promotes ATP-dependent homologous DNA strand exchange. *Nature* 429: 433-437
- SEHORN, M.G. UND SUNG, P. (2004) Meiotic recombination: an affair of two recombinases. *Cell Cycle* 3: 1375-1377
- SEKI, M., NAKAGAWA, T., SEKI, T., KATO, G., TADA, S., TAKAHASHI, Y., YOSHIMURA, A., KOBAYASHI, T., AOKI, A., OTSUKI, M., HABERMANN, F.A., TANABE, H., ISHII, Y. UND ENOMOTO, T. (2006) Bloom helicase and DNA topoisomerase III α are involved in the dissolution of sister chromatids. *Molecular and Cellular Biology* 26: 6299-6307
- SESSIONS, R.A. (1997) *Arabidopsis* (Brassicaceae) flower development and gynoecium patterning in wild type and *ettin* mutants. *American Journal of Botany* 84: 1179-1191
- SHARAN, S.K., MORIMATSU, M., ALBRECHT, U., LIM, D.S., REGEL, E., DINH, C., SANDS, A., EICHELE, G., HASTY, P. UND BRADLEY, A. (1997) Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking *Brca2*. *Nature* 386: 804-810

- SHARAN, S.K., PYLE, A., COPPOLA, V., BABUS, J., SWAMINATHAN, S., BENEDICT, J., SWING, D., MARTIN, B.K., TESSAROLLO, L., EVANS, J.P., FLAWS, J.A. UND HANDEL, M.A. (2004) BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* 131: 131-142
- SHARIF, W.D., GLICK, G.G., DAVIDSON, M.K. UND WAHLS, W.P. (2002) Distinct functions of *S. pombe* Rec12 (Spo11) protein and Rec12-dependent crossover recombination (chiasmata) in meiosis I; and a requirement for Rec12 in meiosis II. *Cell & Chromosome* 1: 1
- SHARMA, S., DOHERTY, K.M. UND BROSH, R.M. JR. (2006) Mechanisms of RecQ helicases in pathways of DNA metabolism and maintenance of genomic stability. *Biochemical Journal* 398: 319-337
- SHELDON, J., WILSON, C. UND DICKENSON, H. (1988) Interaction between the nucleus and cytoskeleton during the pairing stages of male meiosis in flowering plants. In: *Kew Chromosome Conference*, Vol. 3: London: Her Majesty's Stationery Office, 27-35
- SHERIDAN, W.F., AVALKINA, N.A., SHAMROV, I.I., BATYGINA, T.B. UND GOLUBOVSKAYA, I.N. (1996) The *mac1* gene: controlling the commitment to the meiotic pathway in maize. *Genetics* 142: 1009-1020
- SHERIDAN, W.F., GOLUBEVA, E.A., ABRHAMOVA, L.I. UND GOLUBOVSKAYA, I.N. (1999) The *mac1* mutation alters the developmental fate of the hypodermal cells and their cellular progeny in the maize anther. *Genetics* 153: 933-941
- SHERIZEN, D., JANG, J.K., BHAGAT, R., KATO, N. UND MCKIM, K.S. (2005) Meiotic recombination in *Drosophila* females depends on chromosome continuity between genetically defined boundaries. *Genetics* 169: 767-781
- SHERMAN, J.D. UND STACK, S.M. (1995) Two-dimensional spreads of synaptonemal complexes from solanaceous plants. VI. High-resolution recombination nodule map for tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genetics* 141: 683-708
- SHIN, D.S., PELLEGRINI, L., DANIELS, D.S., YELENT, B., CRAIG, L., BATES, D., YU, D.S., SHIVJI, M.K., HITOMI, C., ARVAI, A.S., VOLKMANN, N., TSURUTA, H., BLUNDELL, T.L., VENKITARAMAN, A.R. UND TAINER, J.A. (2003) Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *The EMBO Journal* 22: 4566-4576
- SHINOHARA, A., OGAWA, H. UND OGAWA, T. (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69: 457-470

- SHINOHARA, M., GASIOR, S.L., BISHOP, D.K. UND SHINOHARA A. (2000) Tid1/Rdh54 promotes colocalization of rad51 and dmc1 during meiotic recombination. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 97: 10814-10819
- SHINOHARA, M., SHITA-YAMAGUCHI, E., BUERSTEDDE, J.M., SHINAGAWA, H., OGAWA, H. UND SHINOHARA, A. (1997) Characterization of the roles of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 gene and a homologue of RAD54, RDH54/TID1, in mitosis and meiosis. *Genetics* 147: 1545-1556
- SHIVJI, M.K., DAVIES, O.R., SAVILL, J.M., BATES, D.L., PELLEGRINI, L. UND VENKITARAMAN, A.R. (2006) A region of human BRCA2 containing multiple BRC repeats promotes RAD51-mediated strand exchange. *Nucleic Acids Research* 34: 4000-4011
- SIAUD, N., DRAY, E., GY, I., GÉRARD, E., TAKVORIAN, N. UND DOUTRIAUX MP. (2004) Brca2 is involved in meiosis in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmc1. *The EMBO Journal* 23: 1392-1401
- SIDDIQI, I., GANESH, G., GROSSNIKLAUS, U. UND SUBBIAH, V. (2000) The *dyad* gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis*. *Development* 127: 197-207
- SIEBERT, R. UND PUCHTA, H. (2002) Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *The Plant Cell* 14: 1121-1131
- SIMON, R., IGEÑO, M.I. UND COUPLAND, G. (1996) Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 384: 59-62
- SMYTH, D.R., BOWMAN, J.L. UND MEYEROWITZ, E.M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2: 755-767
- SNOWDEN, T., ACHARYA, S., BUTZ, C., BERARDINI, M. UND FISHEL, R. (2004) hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Molecular Cell* 15: 437-451
- SOGNIER, M.A. UND HITTELMAN, W.N. (1986) Mitomycin-induced chromatid breaks in HeLa cells: a consequence of incomplete DNA replication. *Cancer Research* 46: 4032-4040
- SONODA, E., SASAKI, M.S., MORRISON, C., YAMAGUCHI-IWAI, Y., TAKATA, M. UND TAKEDA, S. (1999) Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Molecular and Cellular Biology* 19: 5166-5169
- SOUSTELLE, C., VEDEL, M., KOLODNER, R. UND NICOLAS, A. (2002) Replication protein A is required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 161: 535-547

- SPURR, A.R. (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31-43
- STACEY, N.J., KUROMORI, T., AZUMI, Y., ROBERTS, G., BREUER, C., WADA, T., MAXWELL, A., ROBERTS, K. UND SUGIMOTO-SHIRASU, K. (2006) Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *The Plant Journal* 48: 206-216
- STACK, S. UND ANDERSON, L. (1986) Two-dimensional spreads of synaptonemal complexes from solanaceous plants. III. Recombination nodules and crossing over in *Lycopersicon esculentum*. *Chromosoma* 94: 253-258
- STACK, S.M. UND ANDERSON, L.K. (2002) Crossing over as assessed by late recombination nodules is related to the pattern of synapsis and the distribution of early recombination nodules in maize. *Chromosome Research* 10: 329-345
- STORLAZZI, A., TESSÉ, S., GARGANO, S., JAMES, F., KLECKNER, N. UND ZICKLER, D. (2003) Meiotic double strand breaks at the interface of chromosome movement, chromosome remodeling, and reductional division. *Genes & Development* 17: 2675-2687
- SUÁREZ-LÓPEZ, P., WHEATLEY, K., ROBSON, F., ONOUCHI, H., VALVERDE, F. UND COUPLAND, G. (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116-1120
- SULLIVAN, N.F. UND WILLIS, A.E. (1992) Cancer predisposition in Bloom's syndrome. *Bioessays* 14: 333-336
- SUN, H., TRECO, D., SCHULTES, N.P. UND SZOSTAK J.W. (1989) Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature* 338: 87-90
- SUN, H., TRECO, D. UND SZOSTAK, J.W. (1991) Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell* 64: 1155-1161
- SUNG, P. (1994) Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* 265: 1241-1243
- SUNG, P., KREJCI, L., VAN KOMEN, S. UND SEHORN, M.G. (2003) Rad51 recombinase and recombination mediators. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 42729-42732
- SUNG, P. UND ROBERSON, D.L. (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* 82: 453-461
- SUZUKI, A., DE LA POMPA, J.L., HAKEM, R., ELIA, A., YOSHIDA, R., MO, R., NISHINA, H., CHUANG, T., WAKEHAM, A., ITIE, A., KOO, W., BILLIA, P., HO, A., FUKUMOTO, M., HUI,

- C.C. UND MAK, T.W. (1997) *Brca2* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Genes & Development* 11: 1242-1252
- SYM, M., ENGBRECHT, J.A. UND ROEDER, G.S. (1993) ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72: 365-378
- SYMINGTON, L.S. UND HOLLOMAN, W.K. (2004) Molecular biology. New Year's resolution – resolving resolvases. *Science* 303: 184-185
- T**
- TAKATA, M., SASAKI, M.S., SONODA, E., MORRISON, C., HASHIMOTO, M., UTSUMI, H., YAMAGUCHI-IWAI, Y., SHINOHARA, A. UND TAKEDA, S. (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal* 17: 5497-5508
- TAKATA, M., TACHIIRI, S., FUJIMORI, A., THOMPSON, L.H., MIKI, Y., HIRAOKA, M., TAKEDA, S. UND YAMAZOE, M. (2002) Conserved domains in the chicken homologue of *BRC42*. *Oncogene* 21: 1130-1134
- TAKATA, M., YAMAMOTO, K., MATSUSHITA, N., KITAO, H., HIRANO, S. UND ISHIAI, M. (2006) The fanconi anemia pathway promotes homologous recombination repair in DT40 cell line. *Subcellular Biochemistry* 40: 295-311
- TARSOUNAS, M., MORITA, T., PEARLMAN, R.E. UND MOENS, P.B. (1999) RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *The Journal of Cell Biology* 147: 207-219
- TAVTIGIAN, S.V., SIMARD, J., ROMMENS, J., COUCH, F., SHATTUCK-EIDENS, D., NEUHAUSEN, S., MERAJVER, S., THORLACIUS, S., OFFIT, K., STOPPA-LYONNET, D., BELANGER, C., BELL, R., BERRY, S., BOGDEN, R., CHEN, Q., DAVIS, T., DUMONT, M., FRYE, C., HATTIER, T., JAMMULAPATI, S., JANECKI, T., JIANG, P., KEHRER, R., LEBLANC, J.F., MITCHELL, J.T., MCARTHUR-MORRISON, J., NGUYEN, K., PENG, Y., SAMSON, C., SCHROEDER, M., SNYDER, S.C., STEELE, L., STRINGFELLOW, M., STROUP, C., SWEDLUND, B., SWENSE, J., TENG, D., THOMAS, A., TRAN, T., TRANCHANT, M., WEAVER-FELDHAUS, J., WONG, A.K., SHIZUYA, H., EYFJORD, J.E., CANNON-ALBRIGHT, L., TRANCHANT, M., LABRIE, F., SKOLNICK, M.H.,

- WEBER, B., KAMB, A. UND GOLDGAR, D.E. (1996) The complete *BRC A2* gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature Genetics* 12: 333-337
- TERASAWA, M., SHINOHARA, A., HOTTA, Y., OGAWA, H. UND OGAWA, T. (1995) Localization of RecA-like recombination proteins on chromosomes of the lily at various meiotic stages. *Genes & Development* 9: 925-934
- TESSÉ, S., STORLAZZI, A., KLECKNER, N., GARGANO, S. UND ZICKLER, D. (2003) Localization and roles of Ski8p protein in *Sordaria* meiosis and delineation of three mechanistically distinct steps of meiotic homolog juxtaposition. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 100: 12865-12870
- THORNE, L.W. UND BYERS, B. (1993) Stage-specific effects of X-irradiation on yeast meiosis. *Genetics* 134: 29-42
- THORSLUND, T., ESASHI, F. UND WEST, S.C. (2007) Interactions between human BRCA2 protein and the meiosis-specific recombinase DMC1. *The EMBO Journal* 26: 2915-2922
- TOMONAGA, T., NAGAO, K., KAWASAKI, Y., FURUYA, K., MURAKAMI, A., MORISHITA, J., YUASA, T., SUTANI, T., KEARSEY, S.E., UHLMANN, F., NASMYTH, K. UND YANAGIDA, M. (2000) Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes & Development* 14: 2757-2770
- TRELLES-STICKEN, E., LOIDL, J. UND SCHERTHAN H. (1999) Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *Journal of Cell Science* 112: 651-658
- TRELLES-STICKEN, E., ADELFAK, C., LOIDL, J. UND SCHERTHAN H. (2005) Meiotic telomere clustering requires actin for its formation and cohesin for its resolution. *The Journal of Cell Biology* 170: 213-223
- TRUJILLO, K.M., ROH, D.H., CHEN, L., VAN KOMEN, S., TOMKINSON, A. UND SUNG, P. (2003) Yeast Xrs2 binds DNA and helps target Rad50 and Mre11 to DNA ends. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 48957-48964
- TSUBOUCHI, H. UND ROEDER, G.S. (2002) The Mnd1 protein forms a complex with hop2 to promote homologous chromosome pairing and meiotic double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* 22: 3078-3088
- TSUBOUCHI, T., ZHAO, H. UND ROEDER, G.S. (2006) The meiosis-specific zip4 protein regulates crossover distribution by promoting synaptonemal complex formation together with zip2. *Developmental Cell* 10: 809-819

- TSUBOUCHI, H. UND ROEDER, G.S. (2003) The importance of genetic recombination for fidelity of chromosome pairing in meiosis. *Developmental Cell* 5: 915-925
- TSUZUKI, T., FUJII, Y., SAKUMI, K., TOMINAGA, Y., NAKAO, K., SEKIGUCHI, M., MATSUSHIRO, A., YOSHIMURA, Y. UND MORITA, T. (1996) Targeted disruption of the *Rad51* gene leads to lethality in embryonic mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93: 6236-6240
- TUNG, K.S. UND ROEDER, G.S. (1998) Meiotic chromosome morphology and behavior in *zip1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 149: 817-832
- TUTT, A., BERTWISTLE, D., VALENTINE, J., GABRIEL, A., SWIFT, S., ROSS, G., GRIFFIN, C., THACKER, J. UND ASHWORTH, A. (2001) Mutation in *Bra2* stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *The EMBO Journal* 20: 4704-4716
- V**
- VALVERDE, F., MOURADOV, A., SOPPE, W., RAVENSCROFT, D., SAMACH, A. UND COUPLAND, G. (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303: 1003-1006
- VAN BRABANT, A.J., YE, T., SANZ, M., GERMAN III, J.L., ELLIS, N.A. UND HOLLOMAN, W.K. (2000) Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase. *Biochemistry* 39: 14617-14625
- VENKITARAMAN, A.R. (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108: 171-182
- VENKITARAMAN, A.R. (2001) Chromosome stability, DNA recombination and the BRCA2 tumour suppressor. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 338-343
- VILLENEUVE, A.M. UND HILLERS, K.J. (2001) *Whence meiosis?* *Cell* 106: 647-650
- VON WETTSTEIN, D., RASMUSSEN, S.W. UND HOLM, P.B. (1984) The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annual Review of Genetics* 18: 331-413

W

- WAGNER, D., SABLONSKI, R.W. UND MEYEROWITZ, E.M. (1999) Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* 285: 582-584
- WALLIS, J.W., CHREBET, G., BRODSKY, G., ROLFE, M. UND ROTHSTEIN, R. (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58: 409-419
- WAN, L., DE LOS SANTOS, T., ZHANG, C., SHOKAT, K. UND N.M. HOLLINGSWORTH, N.M. (2004) Mek1 kinase activity functions downstream of RED1 in the regulation of meiotic double strand break repair in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell* 15: 11-23
- WANG, J.C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 430-440
- WARREN, A.J., MUSTRA, D.J. UND HAMILTON, J.W. (2001) Detection of mitomycin C-DNA adducts in human breast cancer cells grown in culture, as xenografted tumors in nude mice, and in biopsies of human breast cancer patient tumors as determined by ³²P-postlabeling. *Clinical Cancer Research* 7: 1033-1042
- WATANABE, Y. UND NURSE, P. (1999) Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 400: 461-464
- WATERWORTH, W.M., ALTUN, C., ARMSTRONG, S.J., ROBERTS, N., DEAN, P.J., YOUNG, K., WEIL, C.F., BRAY, C.M. UND WEST, C.E. (2007) NBS1 is involved in DNA repair and plays a synergistic role with ATM in mediating meiotic homologous recombination in plants. *The Plant Journal* 52: 41-52
- WATT, P.M. UND HICKSON, I.D. (1996) Failure to unwind causes cancer. Genome stability. *Current Biology* 6: 265-267
- WATT, P.M., LOUIS, E.J., BORTS, R.H. UND HICKSON, I.D. (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
- WEBBER, H.A. HOWARD, L. UND BICKEL, S.E. (2004) The cohesion protein ORD is required for homologue bias during meiotic recombination. *The Journal of Cell Biology* 164: 819-829
- WEIGEL, D., ALVAREZ, J., SMYTH, D.R., YANOFSKY, M.F. UND MEYEROWITZ, E.M. (1992) LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell* 69: 843-859
- WEINER, B.M. UND KLECKNER, N. (1994) Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. *Cell* 77: 977-991

- WEITZER, S., LEHANE, C. UND UHLMANN, F. (2003) A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. *Current Biology* 13: 1930-1940
- WIGGE, P.A., KIM, M.C., JAEGER, K.E., BUSCH, W., SCHMID, M., LOHMANN, J.U. UND WEIGEL, D. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309: 1056-1059
- WIN, T.Z., GOODWIN, A., HICKSON, I.D., NORBURY, C.J. UND WANG, S.W. (2004) Requirement for *Schizosaccharomyces pombe* Top3 in the maintenance of chromosome integrity. *Journal of Cell Science* 117: 4769-4778
- WONG, A.K., PERO, R., ORMONDE, P.A., TAVTIGIAN, S.V. UND BARTEL, P.L. (1997) RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 31941-31944
- WOOSTER, R., NEUHAUSEN, S.L., MANGION, J., QUIRK, Y., FORD, D., COLLINS, N., NGUYEN, K., SEAL, S., TRAN, T., AVERILL, D., ET AL. (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265: 2088-2090
- WU, L., BACHRATI, C.Z., OU, J., XU, C., YIN, J., CHANG, M., WANG, W., LI, L., BROWN, G.W. UND HICKSON, I.D. (2006) BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103: 4068-4073
- WU, H., GAO, J., SHARIF, W.D., DAVIDSON, M.K. UND WAHLS, W.P. (2004) Purification, folding, and characterization of Rec12 (Spo11) meiotic recombinase of fission yeast. *Protein Expression and Purification* 38: 136-1144
- WU, L. UND HICKSON, I.D. (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 426: 870-874

X

- XIA, F., TAGHIAN, D.G., DEFRAK, J.S., ZENG, Z.C., WILLERS, H., ILIAKIS, G. UND POWELL, S.N. (2001) Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98: 8644-8649

Y

- YANG, H., LI, Q., FAN, J., HOLLOMAN, W.K. UND PAVLETICH, N.P. (2005) The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature* 433: 653-657
- YIN, Y., CHEONG, H., FRIEDRICHSEN, D., ZHAO, Y., HU, J., MORA-GARCIA, S. UND CHORY, J. (2002) A crucial role for the putative *Arabidopsis* topoisomerase VI in plant growth and development. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99: 10191-10196
- YIN, J., SOBECK, A., XU, C., MEETEI, A.R., HOATLIN, M., LI, L. UND WANG, W. (2005) BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity. *The EMBO Journal* 24: 1465-1476
- YOSHIDA, K., KONDOH, G., MATSUDA, Y., HABU, T., NISHIMUNE Y. UND MORITA, T. (1998) The mouse *RecA*-like gene *Dmc1* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Molecular Cell* 1: 707-718
- YU, D.S., SONODA, E., TAKEDA, S., HUANG, C.L., PELLEGRINI, L., BLUNDELL, T.L. UND VENKITARAMAN, A.R. (2003) Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Molecular Cell* 12: 1029-1041

Z

- ZETKA, M.C., KAWASAKI, I., STROME, S. UND MÜLLER, F. (1999) Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. *Genes & Development* 13: 2258-2270
- ZHENG, H., WANG, X., WARREN, A. J., LEGERSKI, R. J., NAIRN, R. S., HAMILTON, J. W. UND LI, L. (2003) Nucleotide excision repair- and Polymerase η -mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links. *Molecular and Cellular Biology* 23: 754-761
- ZICKLER, D. (2006) From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. *Chromosoma* 115: 158-174
- ZICKLER, D. UND KLECKNER, N. (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Review of Genetics* 32: 619-697
- ZICKLER, D. UND KLECKNER, N. (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annual Review of Genetics* 33: 603-754

ZICKLER, D., MOREAU, P.J.F., HUYNH, A.D. UND SLEZEC A.M. (1992) Correlation between pairing initiation sites, recombination nodules and meiotic recombination in *Sordaria macrospora*. *Genetics* 132: 135-148

ZIERHUT, C., BERLINGER, M., RUPP, C., SHINOHARA, A., UND KLEIN, F. (2004) Mnd1 is required for meiotic interhomolog repair. *Current Biology* 14: 752-762

Lebenslauf

Rebecca Wurz-Wildersinn, geborene Wurz,
geboren am 07.08.1975 in Rastatt

- | | |
|-------------|---|
| 1982 – 1986 | Grundschule in Rastatt-Ottersdorf |
| 1986 – 1992 | Realschule in Iffezheim |
| 1992 – 1995 | Wirtschaftsgymnasium Rastatt |
| 1995 – 1997 | Schulische Ausbildung zur Pharmazeutisch-Technischen Assistentin,
Carl-Engler-Schule, Karlsruhe |
| 1997 – 1998 | Praktische Ausbildung zur Pharmazeutisch-Technischen Assistentin,
Apotheke Iffezheim |
| 1998 | Angestellte als Pharmazeutisch-Technische Assistentin,
Schlossbergapotheke, Karlsruhe-Wolfartsweier |
| 1998 – 2003 | Studium der Biologie,
Universität Karlsruhe |
| 2003 – 2004 | Diplomarbeit am Botanischen Institut, Lehrstuhl II, Universität Karlsruhe
Thema:
“BRCA1 und BARD1 in <i>Arabidopsis thaliana</i> : Protein-Protein-Interaktion und
die transkriptionelle Antwort auf genotoxischen Stress“ |
| 2004 – 2007 | Doktorandin am Botanischen Institut II, Universität Karlsruhe
Thema: „Untersuchungen zur meiotischen Rekombination in <i>Arabidopsis
thaliana</i> “ |

Publikationen

REIDT, W., **WURZ, R.**, WANIECK, K., CHU, H.H. UND PUCHTA, H. (2006) A homologue of the breast cancer-associated gene BARD1 is involved in DNA repair in plants. *The EMBO Journal* 25: 4326-4337

HARTUNG, F., **WURZ-WILDERSINN, R.**, FUCHS, J., SCHUBERT, I., SUER, S. UND PUCHTA, H. (2007) The catalytically active tyrosine residues of both AtSPO11-1 and AtSPO11-2 are required for meiotic DSB induction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 1-10

