
Untersuchungen zur meiotischen und somatischen Rekombination in Pflanzen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Katharina Seeliger

aus

Schwäbisch Hall

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Holger Puchta

Korreferent: PD Dr. Dietmar Gradl

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2011

für meinen geliebten Ehemann Florian

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Puchta, der mir die Chance gab, die spannende und unglaublich erfahrungsreiche Zeit meiner Promotion zu erleben und mir währenddessen mit seiner Erfahrung zur Seite stand. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir dieses schöne Themengebiet anvertraut hat. Während meiner Doktorarbeit gab er mir zudem die Gelegenheit an der Ausbildung von Biologie-laborantinnen, Lehramtskandidaten und Diplomanden mitzuwirken, auch für die dadurch gewonnene Erfahrung und Unterstützung möchte ich ihm von Herzen danken.

Als nächstes möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Dietmar Gradl bedanken, der ohne Zögern die Aufgabe des Korreferenten übernommen hat und mich dadurch in den letzten Schritten meiner Promotion unterstützt.

Bei den fleißigen Korrekturlesern, allen voran Herr AOR Dr. Manfred Focke, aber auch Frau Dr. Daniela Kobbe, Herr Dr. Alexander Knoll und Frau cand. biol. Annika Dorn, möchte ich mich natürlich auch ganz herzlich bedanken. Außerdem soll an dieser Stelle noch Frau Dipl.-Biol. Susan Schröpfer erwähnt werden, die mich auf den richtigen immuno-zytologischen Kurs brachte, dafür möchte ich ihr meinen Dank aussprechen.

Bei Herrn Prof. Dr. Chris Franklin von der Universität Birmingham, Großbritannien, möchte ich mich sehr herzlich dafür bedanken, dass er mir die an seinem Institut etablierten Primäntikörper für die Meiosezytologie zur Verfügung gestellt hat. Herrn Prof. Dr. Avraham Levy vom Weizman Institut of Science in Rehovot, Israel, sei vielmals für das Micro-Tom Saatgut gedankt.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern der Biochemiearbeitsgruppe für die Unterstützung bedanken, die sie mir während meiner Promotionszeit jederzeit in Gedanken, Worten und Werken haben zukommen lassen. Besonders erwähnen möchte ich hier Herrn AOR Dr. Manfred Focke, Frau Dr. Daniela Kobbe und Herrn Dipl.-Biol. Markus Bauknecht, deren Hilfe für mich untrennbar mit dem Gelingen meiner Arbeit verbunden ist. Sie waren mir eine beständige Stütze während aller Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit und standen mir beim Aufbau meiner Zytologie-Enklave im Hoheitsgebiet der Biochemie mit Rat und Tat zur Seite. Für die tolle technische Unterstützung möchte ich mich zudem besonders bei Frau Biologielaborantin Ramona Bohnet und der Biologielaborantinnen-Auszubildenden Frau Maike Müller bedanken. Ein weiterer Dank gilt an alle Auszubildenden bzw. nun fertig ausgebildeten Biologielaborantinnen, die unser Biochemielabor in Schuss halten und hielten und mir so eine wertvolle Unterstützung waren.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau cand. biol. Annika Dorn bedanken. Die Zusammenarbeit mit ihr war für mich und für das Gelingen dieser Arbeit sehr wertvoll und

die in ihrer Diplomarbeit gewonnenen Ergebnisse kamen dieser Arbeit zu Gute. Weiterhin möchte ich mich auch bei Frau B.Sc. Sarah Jay Reha bedanken, die im Rahmen ihres Projektpraktikums an dieser Arbeit mitgewirkt hat.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Botanischen Gartens, allen voran Frau Traudel Wehrle und Frau Dipl.-Ing Angelika Piernitzki, ohne deren fachmännische Pflege meiner Versuchspflanzen ich meine Experimente so nicht hätte durchführen können.

Zudem sei auch den IT-Beauftragten Herrn Florian Faion und Herrn Michael Meier für das Lösen meiner großen und kleinen Computerprobleme gedankt.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Botanik II für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken – für die fachlichen Diskussionen, für tolle technische Tipps und Tricks, für die Organisation der Arbeitsabläufe im Labor, für all die netten und lustigen Gespräche und die tolle Atmosphäre rund um unser lebenswürdiges Institut. Ich werde euch sehr vermissen und wünsche euch weiterhin wissenschaftlichen Erfolg und vor allem viel Spaß beim Forschen!

Abschließend möchte ich bei meiner Familie, vor allem natürlich bei meinem Ehemann Florian, für das Verständnis, den bedingungslosen Rückhalt und die Liebe bedanken, in deren Licht ich mich meiner Leidenschaft für die Forschung widmen durfte.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Weitergabe genetischer Information: Meiose am Beispiel des Modellorganismus <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
1.2. Somatische DNA-Reparatur	6
1.2.1. Die Induktion von DNA-Schäden und deren Reparatur.....	6
1.2.2. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen.....	7
1.3. Meiotische Rekombination.....	10
1.3.1. Die Induktion und Resektion von Doppelstrangbrüchen	10
1.3.2. Der Strangaustausch und die Stabilisierung früher Rekombinationsintermediate.....	11
1.3.3. Die Non-Crossover / Crossover-Entscheidung	12
1.3.4. Die Bildung Interferenz-sensitiver Crossover	13
1.3.5. Die Bildung Interferenz-insensitiver Crossover	15
1.3.6. Die Bildung von Non-Crossover-Produkten über Dissolution.....	15
1.3.7. Der Zusammenhang zwischen meiotischer Rekombination und Synapsis homologer Chromosomen	16
1.4. Ausgewählte Proteine der somatischen und meiotischen Rekombination	17
1.4.1. Die Rekombinasen RAD51 und DMC1	17
1.4.2. Das Mediatorprotein BRCA2.....	18
1.4.3. Das Heterodimer MSH4/MSH5	20
1.4.4. RecQ-Helikase, TOP3 α und RMI1-RMI2: Das Dissolvasom.....	22
1.4.5. Die Antirekombinase RTEL1.....	23
1.4.6. Die Helikase / Translokase FANCM	24
1.4.7. SPG48 – eine putative Helikase der DNA-Reparaturmaschinerie.....	25
1.5. Die Tomate <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom als neuer Modellorganismus für die Erforschung meiotischer Rekombination.....	26
1.6. Ziele der Arbeit.....	28

2.	Material und Methoden	30
2.1.	Standardchemikalien und Geräte	30
2.2.	Pflanzenarbeiten	30
2.2.1.	Mutantenlinien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
2.2.2.	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Saatgut.....	31
2.2.3.	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
2.2.4.	Anzucht von <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	32
2.2.5.	Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.2.6.	Fertilitätsanalyse von <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.2.7.	Extraktion genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> zur Genotypisierung.....	34
2.2.8.	Extraktion von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> zur Expressionsanalyse	34
2.2.9.	Assay zur Untersuchung von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Hypersensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien.....	35
2.2.10.	Assay zur Quantifizierung der Raten homologer Rekombination in <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
2.3.	Molekularbiologische Arbeiten	37
2.3.1.	Polymerasekettenreaktion	37
2.3.2.	Agarosegelelektrophorese.....	38
2.3.3.	cDNA-Synthese	39
2.3.4.	Semiquantitative PCR zur Expressionsanalyse.....	39
2.3.5.	Aufreinigung von PCR-Fragmenten.....	40
2.3.6.	A-Tailing und Ligation mit pGEM®-T Easy.....	40
2.3.7.	Transformation von <i>E. coli</i>	40
2.3.8.	Plasmidpräparation im Kleinstmaßstab.....	41
2.3.9.	Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten.....	41
2.4.	Bioinformatische Arbeiten.....	42
2.4.1.	Sequenzanalyse zur Bestimmung von Homologen.....	42
2.4.2.	Sequenzanalyse von Proteinen	42
2.5.	Immunologische Arbeiten	43
2.5.1.	Immunisierung zur Gewinnung von Antikörpern.....	43
2.6.	Biochemische Arbeiten	44
2.6.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	44
2.6.2.	Western Blot.....	45
2.6.3.	Entwicklung des Western Blot.....	46
2.6.4.	Crosslinking von Proteinen	47

2.7.	Zytologische Arbeiten	48
2.7.1.	Chromatinpräparation in der Meiose von <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
2.7.2.	Chromatinpräparation in der Meiose von <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.....	49
2.7.3.	Immunolokalisation in der Meiose von <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
3.	Ergebnisse.....	53
3.1.	Das SPG48-Homolog von <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
3.1.1.	Identifikation des SPG48-Homologs in <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
3.1.2.	Charakterisierung von <i>Atspg48</i> T-DNA-Insertionsmutanten	57
3.1.3.	AtSPG48 in der somatischen DNA-Reparatur.....	59
3.1.4.	AtSPG48 in der somatischen homologen Rekombination	61
3.1.5.	AtSPG48 in der Meiose	62
3.2.	Gewinnung von Antikörpern gegen Proteine der meiotischen Rekombination	64
3.2.1.	Gewinnung des RTEL1-N-Peptidantikörpers	64
3.2.1.	Gewinnung des RTEL1-C-Proteinantikörpers	66
3.2.2.	Gewinnung des FANCM-Peptidantikörpers.....	67
3.2.3.	Validierung der gewonnenen Antikörper über SDS-PAGE und Western Blot.....	69
3.3.	Immunolokalisation in <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
3.3.1.	Lokalisierung der Chromatinachsen mit ASY1.....	71
3.3.2.	Visualisierung der Synapsis mit ZYP1.....	72
3.3.3.	Darstellung früher Rekombinationsintermediate mit DMC1 und RAD51.....	73
3.3.4.	Darstellung von Intermediaten der Crossover-Bildung mit MSH4	74
3.4.	Immunolokalisation in Mutanten der meiotischen Rekombination in <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
3.4.1.	Immunolokalisation in der Mutante von AtFANCM	75
3.4.2.	Immunolokalisation in der Mutante von AtRTEL1.....	76
3.4.3.	Immunolokalisation in Mutanten von AtTOP3 α und AtRMI1.....	77
3.4.4.	Immunolokalisation in Mutanten von AtRAD51 und AtBRCA2.....	79
3.5.	Meiose in <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.....	81
3.5.1.	Chromatinpräparation in der Meiose von Micro-Tom	81
4.	Diskussion	84
4.1.	Das SPG48-Homolog in <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
4.2.	Gewinnung von Antikörpern gegen Proteine der meiotischen Rekombination	87
4.3.	Immunolokalisation in <i>Arabidopsis thaliana</i>	89

4.4.	Immunolokalisation in Mutanten der meiotischen Rekombination in <i>Arabidopsis thaliana</i>	91
4.4.1.	Immunolokalisation in Mutanten von AtFANCM.....	91
4.4.2.	Immunolokalisation in Mutanten von AtRTEL1	92
4.4.3.	Immunolokalisation in Mutanten von AtTOP3 α und AtRMI1.....	92
4.4.4.	Immunolokalisation in Mutanten von AtRAD51 und AtBRCA2.....	93
4.4.5.	Rekombination in der Meiose von <i>Arabidopsis thaliana</i>	95
4.5.	Meiose in <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.....	96
5.	Ausblick.....	98
6.	Zusammenfassung	100
7.	Summary.....	102
8.	Literaturverzeichnis	103
9.	Anhang.....	126
	Publikationen.....	i
	Erklärung.....	ii
	Lebenslauf.....	iii

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blüten und Knospen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
Abbildung 2: Bildung des Synaptonemalen Komplex	5
Abbildung 3: Wege der homologen Rekombination in Eukaryoten	9
Abbildung 4: Das MSH4/MSH5-Heterodimer stabilisiert Rekombinationsintermediate	21
Abbildung 5: Micro-Tom in verschiedenen Entwicklungszuständen	28
Abbildung 6: PCR-Ansätze und -Protokolle für alle verwendeten Polymerasen	38
Abbildung 7: Immunisierungsschemata zur Herstellung der Antikörper	43
Abbildung 8: Aufbau des Western Blot Stapels	46
Abbildung 9: Stammbaum von SPG48-Homologen in verschiedenen Organismen	54
Abbildung 10: Alignment der SPG48-Homologe aus Vertebraten und Pflanzen	56
Abbildung 11: Darstellung der Proteine AtSPG48 und HsSPG48	57
Abbildung 12: Intron-Exon-Struktur von <i>AtSPG48</i> und Sequenzanalyse von <i>spg48-1</i>	58
Abbildung 13: Semiquantitative Expressionsanalyse für die Mutante <i>spg48-1</i>	59
Abbildung 14: Untersuchung von <i>spg48-1</i> auf Hypersensitivität gegenüber Bleomycin und MMC	60
Abbildung 15: Interhomologe Rekombination in <i>spg48-1</i>	62
Abbildung 16: Chromatinpräparation in der Meiose von Pollenmutterzellen des Wildtyps Col-0 und der <i>spg48-1</i> -Mutante	63
Abbildung 17: Alignment von AtRTEL1 und AtCHL1 mit Clustal W2	65
Abbildung 18: ELISA-Test für den RTEL1-C-Antikörper	67
Abbildung 19: Aminosäuresequenz von AtFANCM	68
Abbildung 20: Validierung der gewonnenen Antikörper im Western Blot	70
Abbildung 21: Lokalisierung der sich entwickelnden Chromatinachsen mit ASY1 im Wildtyp in verschiedenen Stadien der frühen Prophase 1	72
Abbildung 22: Lokalisation von ZYP1 im Wildtyp während der Ausbildung der Synapsis	72
Abbildung 23: Lokalisation von RAD51 und DMC1 im Wildtyp	73
Abbildung 24: Kontrolllokalisationen für RAD51 und DMC1	74
Abbildung 25: Lokalisation von MSH4 im Wildtyp und der <i>msh4-1</i> -Mutante	74
Abbildung 26: Immunolokalisation in <i>fancm-1</i>	76
Abbildung 27: Immunolokalisation in <i>rtel1-1</i>	77
Abbildung 28: Immunolokalisation in <i>rmi1-1</i> und <i>top3α-2</i>	78
Abbildung 29: Immunolokalisation in <i>rad51-1</i> und <i>brca2</i>	80
Abbildung 30: Größenbestimmung von Knospen von Micro-Tom in der Meiose	82
Abbildung 31: Meiose in <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	83
Abbildung 32: Beteiligung der untersuchten Proteine an der meiotischen Rekombination	95
Abbildung 33: Untersuchung von <i>spg48-1</i> auf Hypersensitivität gegenüber Cisplatin und MMS	129
Abbildung 34: Untersuchung von <i>spg48-1</i> auf Hypersensitivität gegenüber HU und CPT	129
Abbildung 35: Fertilitätsanalyse von <i>spg48-1</i>	130
Abbildung 36: Expressionsvektor für RTEL1-C	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mutantenlinien aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
Tabelle 2: Genotoxine für Sensitivitätsassays	35
Tabelle 3: Rezept für Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE nach Laemmli	45
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper	51
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper	52
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer, Teil I	126
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer, Teil II	127
Tabelle 8: Screening der in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien	127
Tabelle 9: Semiquantitative Expressionsanalyse von <i>spg48-1</i>	128
Tabelle 10: Untersuchungen von <i>spg48-1</i> auf Hypersensitivität gegenüber Genotoxinen	128
Tabelle 11: Interhomologe Rekombination in <i>spg48-1</i>	130
Tabelle 12: PCR zur Gewinnung des Klonierungsfragments RTEL1-C	130

Abkürzungsverzeichnis

AT	Ataxia telangiectasia
BER	Basenexcisionsreparatur
bp	Basenpaare
CO	Crossover
CPT	Camptothecin
cv.	Kultivar
dHJ	doppelte Holliday-Junction
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
esiRNA	über Endoribonuklease hergestellte <i>small interfering RNA</i>
FA	Fanconi Anämie
GUS	β -Glucuronidase
HR	homologe Rekombination
HSP	erbliche spastische Spinalparalyse
HU	Hydroxyurea
ICL	Interstrangcrosslink
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen
MMC	Mitomycin C
MMR	Mismatchreparatur
MMS	Methylmethansulfonat
NCO	Non-Crossover
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNAi	RNA-Interferenz
SAR	erworbene systemische Resistenz
SDSA	<i>Synthesis-dependent Strand-Annealing</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOL	<i>International Solanaceae Genome Project</i>
SSA	<i>Single-Strand-Annealing</i>
WT	Wildtyp

1. Einleitung

An die Mechanismen der homologen Rekombination werden je nach physiologischer Situation völlig gegensätzliche Anforderungen gestellt. Im Falle somatischer DNA-Schäden muss eine Reparatur so stattfinden, dass die strukturelle Stabilität des Genoms unbedingt weiter erhalten bleibt. In der Meiose jedoch sorgt die Rekombination zu einer Durchmischung der Erbanlagen beider Eltern und fördert so die Flexibilität der Zusammenstellung des neuen Genoms. Obwohl das Ziel partiell konträr ist, so bedienen sich beide Mechanismen grundlegend gleicher Abläufe und auch für viele Proteine konnte eine Rolle in beiden Mechanismen beschrieben werden. Dies erfordert ein komplexes Netzwerk der Prozesse und deren straffe Regulation.

Da Pflanzen im Gegensatz zu Tieren keine präformierte Keimbahn besitzen, sondern sich generative Zellen aus vegetativen Geweben entwickeln, bewegt sich das Genom der Pflanzen in einem besonderen Spannungsfeld zwischen Stabilität und Flexibilität. Dennoch sind die Prozesse der DNA-Reparatur und –Rekombination evolutionär hoch konserviert und es können Vergleiche zwischen den Reichen des Lebens gezogen werden. Dies macht die Untersuchung von Prozessen der somatischen und meiotischen Rekombination in Pflanzen zu einem Forschungsgebiet von intra- und interdisziplinärem Interesse.

1.1. Die Weitergabe genetischer Information: Meiose am Beispiel des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*

Die Weitergabe der Merkmale von Eltern an ihre Kinder beschäftigt die Menschheit seit langer Zeit und die von Hippokrates aufgestellte Theorie der Pangenese – die Idee, dass eine Essenz aller Körperzellen zur Weitergabe der Merkmale von Eltern auf die Kinder erforderlich sei, war über viele Jahrhunderte allgemein akzeptiert (Übersicht in Darlington 1977; Hamoir 1992; Petronczki *et al.* 2003; Richmond 2006 und Referenzen innerhalb dieser Arbeiten). Erst ab dem späten 18. Jahrhundert, durch die Arbeiten des Karlsruher Botanikers Joseph Köhltreuter, die bahnbrechenden Versuche des Augustinermönchs Gregor Mendel und die Arbeiten von Corren, de Vries und Tschermak, die Mendels Arbeit Anfang des 20. Jahrhunderts wiederentdeckten, wurde die Chromosomentheorie der Vererbung geboren. Die Meiose wurde zum ersten Mal 1876 in Seeigeleiern vom deutschen Biologen Oscar Hertwig beschrieben. Hertwig beobachtete, dass der väterliche Samen und der Kern der mütterlichen Eizelle bei der Befruchtung verschmelzen. Walther Flemming untersuchte die somatische Zellteilung und beschrieb sie 1882 als Mitose. 1883 machte Edouard von Beneden in den Eiern von parasitischen Nematoden die entscheidende Entdeckung, dass die Gameten nur zwei Chromosomen besitzen, die Zygote jedoch vier. In weiterführenden Arbeiten postulierten Hertwig, Eduard Straßburger und August Weismann, dass die Erbinformation in den Zellkernen der Gameten lokalisiert sein müsse. Dies wurde durch Theodore Boveri 1889 experimentell bestätigt. Weismann erkannte außerdem 1890, dass zwei Kernteilungen notwendig wären, um eine diploide Zelle in vier haploide Zellen zu teilen, damit nach der Verschmelzung beider Gameten die Anzahl an Chromosomen konstant bleiben könnte. Nach der Wiederentdeckung der Werke von Mendel postulierten Boveri und Walter Sutton 1903 die Chromosomentheorie der Mendel'schen Vererbung. Boveris Entdeckung, dass jedes Chromosom einzigartige Informationen trägt, die für die Entwicklung des Gesamtorganismus gebraucht werden, war letztlich die Grundlage für die Entdeckung des Genoms. Der Term Meiose wurde erst 1905 von Farmer und Moore nach dem griechischen Wort für Reduktion eingeführt. Nach diesen Pionierarbeiten, die die grundlegenden Mechanismen zur Weitergabe genetischer Information ans Licht brachten, konnte bis zum heutigen Tag natürlich ein sehr viel detaillierteres Bild über die physikalischen Vorgänge der Reduktionsteilung erstellt werden. Im Folgenden sollen nun die Erkenntnisse über die Vorgänge der Gametenentstehung mit der dabei stattfindenden Meiose in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* genauer dargestellt werden.

In Samenpflanzen, wie *Arabidopsis thaliana*, findet die männliche Gametogenese in den Antheren, die weibliche Gametogenese im Fruchtknoten statt (Übersicht in Wilson und Yang 2004; Boavida *et al.* 2005). Abbildung 1 zeigt links eine geöffnete Blüte aus *Arabidopsis thaliana* in Nahaufnahme. Zentral befindet sich der Fruchtknoten mit der obenauf sitzenden Narbe umgeben von sechs Antheren, bedeckt mit reifen, gelben Pollenkörnern. Rechts ist eine Reihe von Knospen zu sehen, in denen gerade die Meiosen zur Bildung der Gametophyten ablaufen. Außerdem ist eine mit Pinzetten eröffnete Knospe mit unreifen Antheren und Fruchtknoten dargestellt.

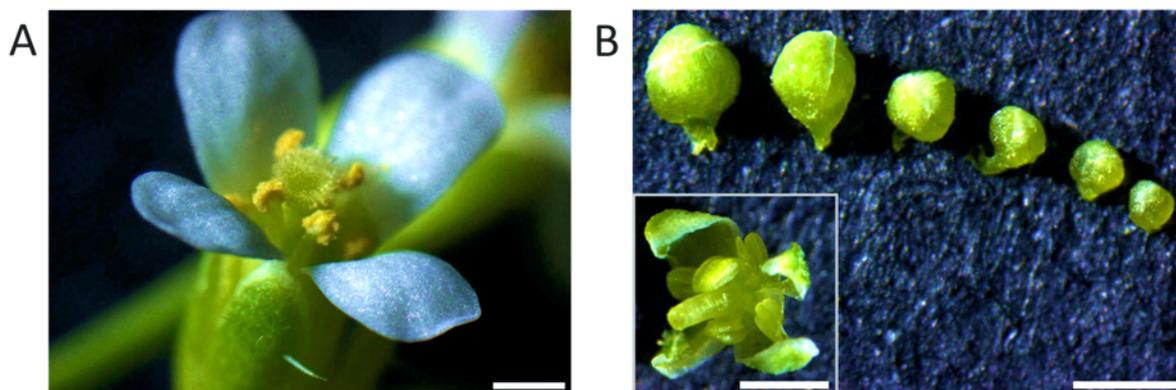


Abbildung 1: Blüten und Knospen von *Arabidopsis thaliana*. (A) zeigt eine geöffnete Blüte, zentral ist der Fruchtknoten mit der Narbe zu erkennen, um den insgesamt 6 Antheren mit reifen, gelben Pollenkörnern angeordnet sind. (B) zeigt den Entwicklungsbereich der Knospen, in denen die Meiose abläuft, eine durch Pinzetten eröffnete Knospe ist links unten gezeigt. Der Größenmarker repräsentiert 500 µm.

In einem typischen Fruchtknoten in *Arabidopsis* finden sich ca. 50 Samenanlagen (Wilson und Yang 2004). Die Samenanlage enthält die Megasporenmutterzelle, die letztlich die Meiose durchläuft und vier Tochterkerne bildet. Von diesen vier Tochterkernen degenerieren allerdings drei. Welcher der Kerne erhalten bleibt, entscheidet deren Lage zur Chalaza, dem Knospengrund an der Basis der Samenanlage, von dem die Integumente ausgehen. Der Kern, der der Chalaza am nächsten ist, bleibt erhalten und durchläuft drei weitere mitotische Teilungen zum Embryosack, der zunächst 8 Kerne enthält (Smyth *et al.* 1990; Schneitz *et al.* 1997; Schneitz *et al.* 1998; Schneitz 1999; Skinner *et al.* 2004). Zwei dieser Kerne verschmelzen und bilden die zentrale Zelle, die später zum triploiden Endospermvorläufer befruchtet wird. Ein typischer Embryosack enthält somit sieben Zellen, neben der zentralen Zelle noch drei Antipoden am gegensätzlichen Pol zu einer Eizelle, die von zwei Synergiden umgeben wird (Smyth *et al.* 1990; Grossniklaus und Schneitz 1998). Die männlichen Gameten, die Pollen, werden aus den Mikrosporenmutterzellen, oder auch Pollenmutterzellen gebildet. In *Arabidopsis* befinden sich ca. 30 Pollenmutterzellen pro Anthere, bei einer Antherenzahl von sechs pro Knospe also insgesamt ca. 240 Pollenmutterzellen, die sich letztlich relativ synchron zu ca. 920 Pollen pro *Arabidopsis*-

Knospe entwickeln (Wilson und Yang 2004). Die Pollenmutterzellen durchlaufen die Meiose, in der vier Mikrosporen entstehen, die zunächst noch von einer Callose-Schicht umgeben sind (McCormick 1993). Nach dem Abbau dieser Hülle durchläuft jede Mikrospore zwei weitere mitotische Teilungen, zunächst eine asymmetrische Teilung in eine große vegetative und eine kleine generative Zelle (Eady *et al.* 1995). Dann teilt sich der generative Kern abermals, damit letztlich die doppelte Befruchtung des Embryosacks, der haploiden Eizelle und der diploiden Zentralzelle erfolgen kann (Faure 2001; Ma 2005).

In der Meiose werden zwei Kernteilungen nacheinander vollzogen, die als Meiose I und Meiose II bezeichnet werden (Übersicht in Harrison *et al.* 2010). In der prämeiotischen S-Phase, auch als Präleptotän bezeichnet, wird durch die Etablierung von Kohäsinkomplexen, die beide Schwesterchromatide umfassen, die sogenannte Schwesterchromatidkohäsion etabliert, die während der Meiose bis zum Zeitpunkt der Auftrennung der Schwesterchromatide in der Meiose II bestehen bleibt. Die Aufhebung der Kohäsion findet dabei in zwei Schritten statt, die Kohäsion an den Chromosomarmen wird in der Anaphase I, die Kohäsion an den Zentromeren, jedoch erst in der Anaphase II gelöst (Nasmyth und Haering 2005; Mercier und Grelon 2008; Schubert 2009). Die Telomere der Chromosomen sind in der somatischen und auch in der prämeiotischen Interphase um den Nukleolus organisiert (Roberts *et al.* 2009).

In der Prophase I der Meiose erfolgt eine intensive Kondensation der Chromosomen und die Synapsis homologer Chromosomen. Am Ende der Prophase I sind diese zu Bivalenten zusammengelagert und Überkreuzungen, sogenannte Chiasmata, zwischen den Homologen werden sichtbar. Diese sind durch den Prozess der meiotischen Rekombination entstanden, dessen Ablauf und Bedeutung für die homologe Paarung sollen in Kapitel 1.3 näher beschrieben werden. Die Prophase I kann ihrerseits in verschiedene Abschnitte unterteilt werden. Im Leptotän wird die Chromatinachse etabliert. Das Chromatin ist in Schleifen organisiert, die an einer Achse aus Proteinen angeordnet sind (Kleckner 2006; Sanchez-Moran *et al.* 2008; Osman *et al.* 2011; Abbildung 2). Die homologen Chromosomen beginnen ab dem Zygotänstadium sich zu paaren. Es wird eine dreiteilige Struktur aus den beiden Chromatinachsen als lateralen Elementen aufgebaut, welche durch transversale Proteinfilamente verbunden werden. Diese Struktur wird als Synaptonemaler Komplex bezeichnet (Page und Hawley 2004; Kleckner 2006). Die Synapsis der homologen Chromosomen ist im Pachytän vollständig abgeschlossen und wird im anschließenden Diplotän wieder aufgelöst. Nach einer massiven Kondensation der Chromosomen hin zum Stadium der Diakinese sind die homologen Chromosomenpaare nur noch über die Chiasmata verbunden. Die Ausbildung der Synapsis und die Bildung der Bivalente sind in komplexer Weise mit der Initiation und dem Fortschreiten der homologen Rekombination verbunden. Dies soll im Anschluss an die Beschreibung der Prozesse der meiotischen Rekombination genauer erörtert werden (siehe Kapitel 1.3).

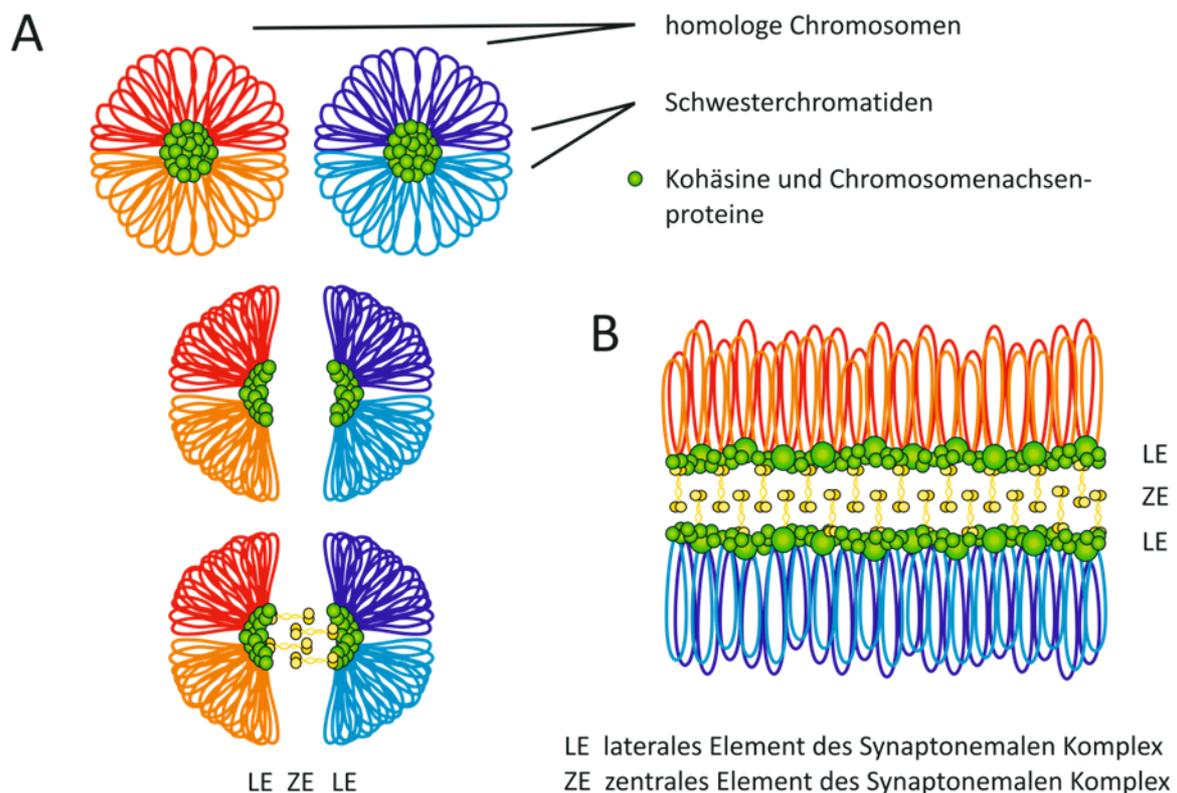


Abbildung 2: Bildung des Synaptonemalen Komplex. (A) Die Chromatinachse wird etabliert, das Chromatin ist in Schleifen an einer Proteinachse organisiert. Die homologen Chromosomen nähern sich und der Synaptonemal Komplex wird ausgebildet. Die Chromatinachsen bilden die lateralen Elemente, zwischen denen transversale Proteinfilamente das zentrale Element bilden. (B) Seitliche Ansicht des Synaptonemalen Komplex. Die dreiteilige Struktur aus lateralen Elementen und zentralem Element ist gut erkennbar (Abbildung verändert nach Osman *et al.* 2011).

Die Telomere sind in der frühen Meiose homolog gepaart und immer noch um den Nucleolus arrangiert. Sie werden vor der Synapsis zur nukleären Membran bewegt und zeigen nur eine lockere Anhäufung, die nach Abschluss der Synapsis aufgelöst wird. Am Ende der Prophase I dissoziieren sie von der Membran (Roberts *et al.* 2009).

In der Metaphase I lagern sich die Bivalente in der Äquatorialebene an und die homologen Chromosomen werden in der Anaphase I zu den gegensätzlichen Polen gezogen. Die Kohäsion der Schwesterchromatide wird dabei über die Zentromere bewahrt. In der Telophase I liegen daher zwei Gruppen vollständiger Chromosomen an den Polen. Die Meiose II erfolgt analog, nur werden hier die Schwesterchromatiden der Chromosomen separiert und am Ende der Meiose liegen vier haploide Gruppen Chromatide vor. Nun werden je nach geschlechtlichem Kontext die weiteren Teilungen zur Ausbildung eines reifen Embryosacks bzw. reifer Pollen durchgeführt. Die Meiose in *Arabidopsis thaliana* Pollenmutterzellen dauert ca. 33 Stunden. Den allergrößten Zeitraum benötigt die Prophase I mit einer Dauer von ca. 30 Stunden. Die nachfolgenden Teilungen dauern nur ca. 3 Stunden (Armstrong *et al.* 2003; Osman *et al.* 2011). Dies unterstreicht die Komplexität der Prozesse, welche in der Prophase I zur Bivalentformation führen.

1.2. Somatische DNA-Reparatur

1.2.1. Die Induktion von DNA-Schäden und deren Reparatur

Das Genom wird kontinuierlich durch exogene und endogene Faktoren geschädigt. Zu den exogenen Faktoren zählen u.a. UV-Strahlung, ionisierende Strahlung und chemische Agenzien. Als endogene Faktoren können z.B. Replikationsfehler und Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies genannt werden. Je nach Art des Schadens werden verschiedene Wege zu dessen Reparatur aktiviert (Übersicht in Ciccia und Elledge 2010).

Durch den Mechanismus der Photoreaktivierung können Alkylierungen, Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und (6,4)-Photoprodukte direkt repariert werden. Dies wird durch das Enzym Photolyase katalysiert, das Lichtenergie nutzt, um Schadensprodukte wieder in ihren ursprünglichen Zustand zu überführen (Brettel und Byrdin 2010). Photolyasen kommen in Pflanzen und Pilzen vor, jedoch nicht in Säugern.

Über Excisionsreparatur können schadhafte Stellen der DNA entfernt werden, sofern sie nur einen der beiden Doppelstränge betreffen. Die Mismatchreparatur (MMR) sorgt für den Austausch von während der Replikation falsch eingebauten Basen (Iyer *et al.* 2006; Larrea *et al.* 2010). Der fehlerhaft synthetisierte Strang wird so geschnitten, dass er freigesetzt werden kann. Durch Reparatursynthese wird die entstandene Lücke wieder geschlossen und abschließend ligiert. In der Basenexcisionreparatur (BER) werden beschädigte Basen, zum Beispiel nach Hydrolyse oder Alkylierung, ausgetauscht (Baute und Depicker 2008; Robertson *et al.* 2009). Dabei wird die beschädigte Base oder ein kurzes Oligonukleotid entfernt und eine Reparatursynthese mit anschließender Ligation schließt die Reparatur ab. In der Nukleotidexcisionsreparatur (NER) werden Schäden erkannt und entfernt, die große topologische Veränderungen der DNA bewirken, wie z.B. auch Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere, die bei Nichtverfügbarkeit der Photoreaktivierung über die NER repariert werden (Reardon und Sancar 2005; Tuteja *et al.* 2009). Dazu wird auch hier das den Schaden enthaltene Oligonukleotid aus der Doppelhelix herausgeschnitten, dann erfolgt Reparatursynthese und Ligation.

Trifft eine Replikationsgabel auf einen unüberwindbaren DNA-Schaden, der zuvor durch die Reparatursysteme unentdeckt blieb, können verschiedene Wege beschritten werden. Betrifft der Schaden nur einen Strang, so kann dieser in Schadenstoleranzwegen umgangen werden. Durch spezielle Polymerase können in der Translänionssynthese gegenüber der Schadensstelle komplementäre oder auch nicht komplementäre Nukleotide eingebaut werden (Waters *et al.* 2009; Ho und Scharer 2010). In der postreplikativen Reparatur wird zunächst die Synthese beider Elternstränge entkoppelt, am fehlerfreien Strang kann weiter repliziert werden. Nach dem Arrest der Replikationsgabel wird diese zu

einer sogenannten Chicken Foot-Struktur rückwärtsgewunden, so dass anhand des schon gebildeten Stranges die Synthese des anderen Tochterstranges geleistet werden kann. Nach einer Rückentwindung kann die Replikation dann nach der Schadensstelle fortgesetzt werden (Chen *et al.* 2008; Mannuss *et al.* 2010). Auch Mechanismen der homologen Rekombination können zur Reparatur stehengebliebener Replikationsgabeln verwendet werden. Durch Endonukleasen können dabei einseitige Doppelstrangbrüche eingeführt werden und eine Induktion der homologen Reparatur findet ähnlich wie bei der Doppelstrangbruchreparatur statt (Li und Heyer 2008).

1.2.2. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Ionisierende Strahlung, freie Radikale, Replikationsfehler, Topoisomerasefehler und mechanischer Stress kann zu Doppelstrangbrüchen in der DNA führen (Übersicht in Lieber 2010). Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen stellt die Reparaturmaschinerie vor die besondere Herausforderung, dass keine komplementäre Sequenz unmittelbar verfügbar ist, um die defekten Informationen zu restaurieren. Es können prinzipiell drei Mechanismen der Reparatur unterschieden werden: die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ), das *Single-Strand-Annealing* (SSA) und die homologe Rekombination (HR; Übersicht in Heyer *et al.* 2010; Kass und Jasin 2010).

Beim NHEJ werden die freien Enden des Doppelstrangbruchs zunächst gebunden und zusammengehalten (Übersicht in Puchta 2005; Lieber 2010). Die DNA wird nach nukleolytischer Prozessierung religiert. Verschiedene Polymerasen werden benötigt, um die Lücken in der DNA zu füllen. Beim NHEJ können Punktmutationen, Deletionen, aber auch Insertionen von nicht-homologen Bereichen des Genoms auftreten (Puchta 1999; Kirik *et al.* 2000).

Der SSA-Weg kann nur dann genutzt werden, wenn sich an beiden Seiten des Bruchs wiederkehrende Sequenzen befinden. Die beiden Enden werden so prozessiert, dass die Überhänge zueinander homolog sind und dadurch paaren können. Nach dem Abtrennen der überstehenden Enden kann eine Ligation des Bruchs erfolgen. Durch das SSA gehen Sequenzwiederholungen verloren (Siebert und Puchta 2002).

Bei der homologen Rekombination (siehe Abbildung 3; Übersicht in San Filippo *et al.* 2008; Heyer *et al.* 2010) schließt sich einem Doppelstrangbruch zunächst die Prozessierung der Bruchenden an. Dies wird zunächst in der Bäckerhefe durch den MRX-Komplex (MRN-Komplex in Säugern) in Zusammenarbeit mit Sae2 (CtIP in Säugern) vermittelt. Weiterführende Resektion wird dann durch die Nukleasen Exo1 und Dna2 in Zusammenarbeit mit der RecQ-Helikase Sgs1 (BLM in Säugern) ausgeführt. Es werden so

lange 3'-Einzelstrangüberhänge erzeugt, die zunächst mit dem Einzelstrangbindeproteinkomplex RPA gebunden werden (Abbildung 3 C). Daraufhin erfolgt die Mediator-vermittelte Bildung von Nucleoproteinfilamenten der Rekombinase Rad51, durch die gebundenes RPA verdrängt wird. Als Mediator dient in der Bäckerhefe Rad52, im Menschen jedoch das Brustkrebs-assoziierte Protein BRCA2 (eine nähere Beschreibung erfolgt in Kapitel 1.4.2). Das Rad51-Nucleoproteinfilament invadiert in homologe Sequenzen und es bildet sich eine sogenannte D-Loop-Struktur aus, in der der eingedrungene Strang gepaart wird (Abbildung 3 D). Anhand des gepaarten Stranges kann nun der eingedrungene Strang verlängert werden (Abbildung 3 E). Anschließend kann die homologe Rekombination über zwei verschiedene Wege weitergeleitet werden.

Nach dem *Synthesis-dependent Strand-Annealing*-Modell (SDSA) wird der verlängerte invadierte Strang wieder aus dem D-Loop herausgelöst und kann über den prozessierten Doppelstrangbruch hinweg mit dem gegenüberliegenden Einzelstrangüberhang paaren. Anschließend werden die Lücken durch Polymerasen geschlossen und das Rückgrat der DNA wird ligiert (Nassif *et al.* 1994; Abbildung 3 F-I).

In der Reparatur nach dem Doppelstrangbruchreparaturmodell (DSBR) wird die D-Loop-Struktur so stark erweitert, dass der verdrängte Strang eine Paarung mit dem zweiten Bruchende eingehen kann und so eine Struktur mit zwei Überkreuzungspunkten entsteht (Szostak *et al.* 1983). Diese wird als doppelte Holliday-Junction (dHJ) bezeichnet. Diese Verknüpfung zwischen Doppelsträngen kann nun prinzipiell über zwei verschiedene Mechanismen gelöst werden. So können Endonukleasen über das Einfügen zweier Schnitte eine Resolution der dHJ entweder in ein Non-Crossover- oder ein Crossover-Produkt bewirken (Abbildung 3 J-M).

Alternativ kann eine Prozessierung durch den RTR-Komplex erfolgen, in der eine Dissolution der dHJ erfolgt: die beiden Überkreuzungspunkte werden aufeinander zugeschoben, bis eine Hemicatenanstruktur entsteht, die von einer Topoisomerase ausschließlich zu einem Non-Crossover-Ereignis aufgelöst wird (Bachrati und Hickson 2009; Abbildung 3 N-O).

Doppelstrangbrüche werden in somatischen Geweben höherer Eukaryoten vor allem über das NHEJ repariert, nur in der späten S- oder der G2-Phase ist eine Reparatur über homologe Rekombination möglich (Salomon und Puchta 1998; Kass und Jasin 2010). In der Meiose jedoch werden die induzierten Doppelstrangbrüche ausschließlich über die homologe Rekombination repariert (Cole *et al.* 2010).

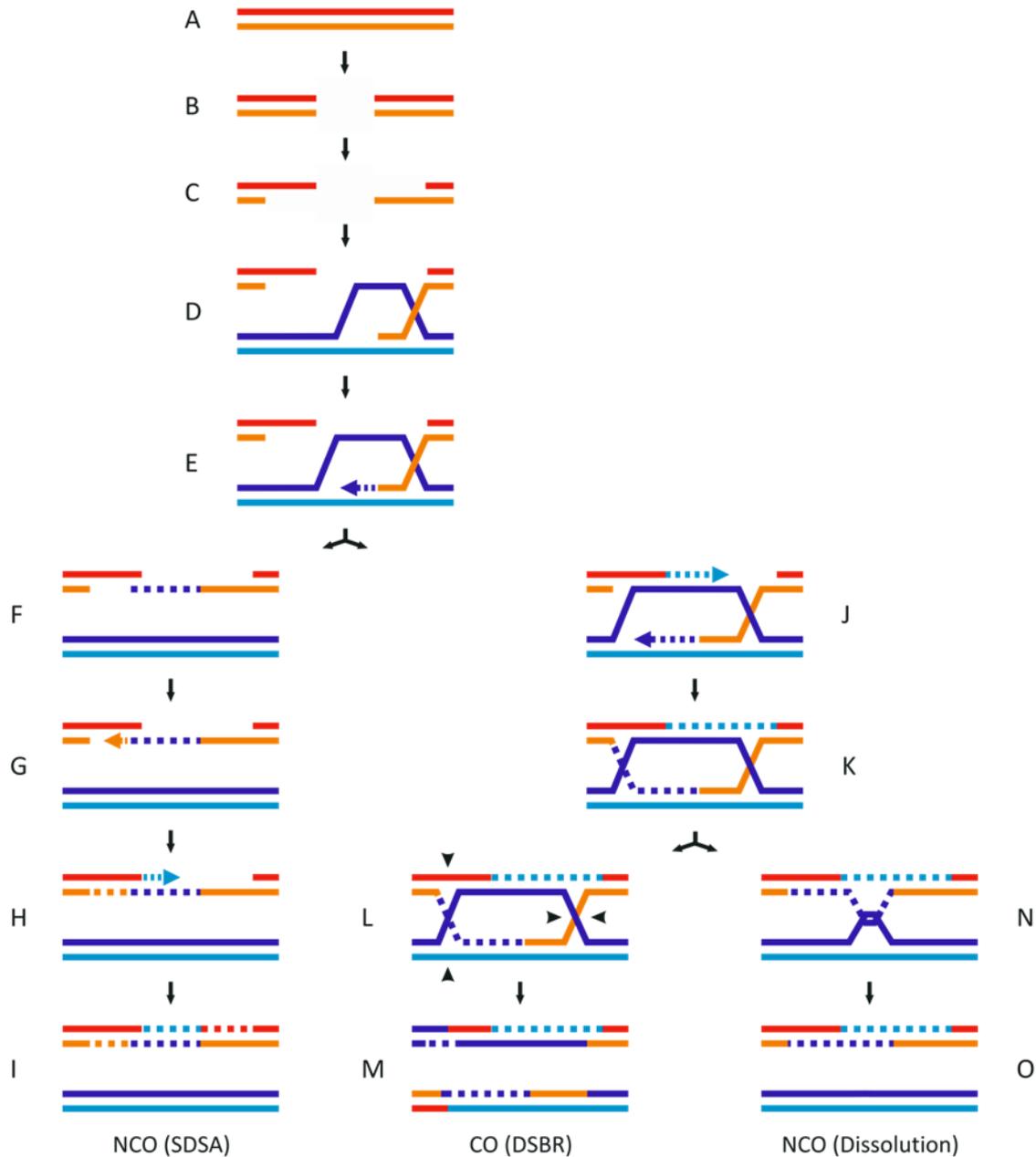


Abbildung 3: Wege der homologen Rekombination in Eukaryoten. (B) Nach dem Auftreten eines Doppelstrangbruch werden zunächst (C) die Enden resektiert und 3'-Einzelstrangüberhänge generiert. (D) Es erfolgt die Invasion in einen homologen Doppelstrang und dabei die Ausbildung einer D-Loop-Struktur. (E) Anhand der homologen Matrize kann der invadierte Strang verlängert werden. (F) Nach dem SDSA-Modell der HR wird der invadierte Strang wieder herausgelöst und (G,H) es können die Sequenzlücken anhand der vorhandenen Stränge geschlossen werden. (I) Es werden ausschließlich Non-Crossover-Produkte (NCO) erzeugt. (J) Alternativ wird der D-Loop so erweitert, dass der verdrängte Strang mit dem nicht-invadierten Überhang paaren kann und (K) es wird eine doppelte Holliday-Junction (dHJ) ausgebildet. (L) Diese kann nach dem DSBR-Modell über Nucleasen resolviert werden und es können NCO- und Crossover-Produkte (CO) gebildet werden. Dargestellt ist das asymmetrische Schnittmuster, das zur CO-Bildung führt. (N) Die dHJ kann auch über den Weg der Dissolution prozessiert werden. Dabei werden Überkreuzungspunkte aufeinander zubewegt, so dass eine Hemicatenanstruktur entsteht. Diese kann über eine Topoisomerase ausschließlich zu einem NCO-Produkt aufgelöst werden. Gestrichelte Linien deuten die Neubildung von DNA-Strängen an, die Resolvase-Schnittstellen werden durch Pfeilspitzen dargestellt (verändert nach Knoll und Puchta 2011).

1.3. Meiotische Rekombination

1914 machte Thomas Hunt Morgan bei der Untersuchung von Fruchtfliegen eine erstaunliche Entdeckung: Er bestimmte sogenannte Kopplungsgruppen von Merkmalen, die immer gemeinsam vererbt wurden und erkannte daraufhin, dass diese gemeinsam auf einem Chromosom liegen müssen. Allerdings stellte er fest, dass in einem kleinen Anteil von Nachkommen diese Kopplung aufgehoben zu sein schien und nannte dieses Ereignis Crossover (Morgan 1915). Er postulierte, dass die zwei homologen Chromosomen Stücke ausgetauscht haben mussten und beschrieb damit das Ergebnis der meiotischen homologen Rekombination. Die Mechanismen der meiotischen Rekombination wurde vor allem durch Studien mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* etabliert. Die meiotische homologe Rekombination folgt prinzipiell dem Schema der somatischen homologen Rekombination, allerdings dient sie einem anderen Zweck: Während es in somatischen Zellen in den meisten Fällen darum geht, einen Doppelstrangbruch so zu reparieren, dass der entstandene Schaden möglichst folgenlos behoben wird, so dient die meiotische Rekombination der genetischen Vielfalt und ihr korrektes Ablaufen ist eine Grundvoraussetzung für die korrekte Verteilung der Chromosomen in der meiotischen Teilung (Andersen und Sekelsky 2010). Im Folgenden sollen die wichtigsten Charakteristika der meiotischen homologen Rekombination in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* detailliert dargestellt werden.

1.3.1. Die Induktion und Resektion von Doppelstrangbrüchen

Die Initiation der meiotischen Rekombination erfolgt durch die programmierte Einführung von Doppelstrangbrüchen (Übersicht unter anderem in Mercier und Grelon 2008; De Muyt *et al.* 2009a; De Muyt *et al.* 2009b; Osman *et al.* 2011). Dies wird in der Bäckhefe durch Spo11 katalysiert, einem Homolog zur Untereinheit A der archaebakteriellen Topoisomerase 6 (Bergerat *et al.* 1997; Keeney *et al.* 1997). In Pollenmutterzellen aus *Arabidopsis thaliana* werden ca. 150 Doppelstrangbrüche erzeugt (Sanchez-Moran *et al.* 2007). Dabei funktionieren die beiden SPO11-Paraloge SPO11-1 und SPO11-2 in *Arabidopsis* als Heterodimer (Hartung und Puchta 2000; Grelon *et al.* 2001; Hartung und Puchta 2001; Stacey *et al.* 2006; Hartung *et al.* 2007b). SPO11 assoziiert schon im frühen Leptotän mit dem Chromatin, aber erst während der Chromatinachsenbildung im Leptotän werden die Doppelstrangbrüche erzeugt (Sanchez-Moran *et al.* 2007). Mutanten von SPO11-1 oder SPO11-2 zeigen einen asynaptischen Phänotyp und keine Bivalentbildung. Durch ungleiche Verteilung der Chromosomen kommt es zur Bildung von Polyaden (Grelon *et al.* 2001; Stacey *et al.* 2006; Hartung *et al.* 2007b). Als weitere assoziierte Faktoren der Doppelstrangbruchinduktion wurden in *Arabidopsis* die Proteine PRD1, PRD2 und PRD3 identifiziert (De

Muyt *et al.* 2007; De Muyt *et al.* 2009a). Auch Mutanten dieser Proteine sind asynaptisch und zeigen keine Bivalentbildung und ungleiche Chromosomenverteilung.

Nach der Doppelstrangbruchinduktion werden die beiden 5'-Enden der Doppelstränge wiederum resektiert. In der Meiose wie in der somatischen HR vermittelt diese Resektion in der Bäckerhefe der MRX-Komplex (MRN-Komplex in Säugetieren), bestehend aus Mre11, Rad50 und Xrs2 (NBS1 in Säugetieren) in Zusammenarbeit mit dem Protein Com1/Sae2 (CtIP in Säugetieren; Übersicht in Mimitou und Symington 2009). Durch asymmetrische endonukleolytische Schnitte wird das gebundene Spo11 gemeinsam mit kurzen Oligonukleotiden entfernt (Neale *et al.* 2005). Weitere Resektion wird wie in der somatischen Reparatur auch über die RecQ-Helikase Sgs1 und die Nukleasen Exo1 und Dna2 vermittelt. Arabidopsis-Mutanten von MRE11 und RAD50 zeigten keine Bivalentbildung und schwere Chromosomenfragmentierung (Bleuyard *et al.* 2004b; Puizina *et al.* 2004). Eine *Atnbs1*-Einzelmutante zeigte nur einen milden meiotischen Phänotyp, der allerdings durch die Expression eines Restfragmentes begründet werden kann (Waterworth *et al.* 2007). Mutanten von COM1 in *Arabidopsis thaliana* zeigen einen vergleichbaren Phänotyp zu den *mre11*- und *rad50*-Mutanten (Uanschou *et al.* 2007). Insgesamt ist die Funktion des MRX/MRN-Komplexes in Zusammenspiel mit COM1 also auch in Arabidopsis konserviert.

1.3.2. Der Strangaustausch und die Stabilisierung früher Rekombinationsintermediate

Nach der Resektion am Doppelstrangbruch sind 3'-Einzelstrangüberhänge entstanden, die nun in homologe Bereiche invadieren. Zusätzlich zur Rekombinase Rad51, die eine Invasion in Schwesterchromatide ermöglicht, ist in der Meiose in der Bäckerhefe das Paralog Dmc1 involviert, welches spezifisch die Invasion in das homologe Chromosom katalysiert (Shinohara und Shinohara 2004). Auch in Arabidopsis werden diese Aufgaben von den Paralogen RAD51 und DMC1 ausgeführt, eine genauere Beschreibung der Proteine und deren Funktion erfolgt in Kapitel 1.4.1.

Als weitere Paraloge von Rad51 und Dmc1 werden in der Bäckerhefe Rad55 und Rad57 beschrieben (Übersicht in San Filippo *et al.* 2008), die einen Einfluss auf die Effizienz des Rad51- bzw. Dmc1-katalysierten Strangaustausch haben. Vertebraten besitzen neben RAD51 und DMC1 weitere fünf RAD51 Paraloge: RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 (Symington 2002), die in zwei Komplexen vorkommen: RAD51B/C/D/XRCC2 und RAD51C/XRCC3 (Masson *et al.* 2001). Diese sind in der somatischen DNA Reparatur involviert, für RAD51C konnte auch eine Rolle in der Meiose beschrieben werden (Kuznetsov *et al.* 2007). Von den auch in Arabidopsis konservierten RAD51-Paralogen RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 sind nur RAD51C und XRCC3 in die Meiose involviert (Osakabe *et al.*

2002; Bleuyard *et al.* 2004a; Bleuyard und White 2004; Abe *et al.* 2005; Bleuyard *et al.* 2005; Li *et al.* 2005; Osakabe *et al.* 2005; Vignard *et al.* 2007). Diese zeigen einen zur *rad51*-Mutante ähnlichen Phänotyp mit Asynapsis und schweren Chromosomenfragmentierungen.

Der Komplex aus den Proteinen Mnd1 und Hop2 fördert und stabilisiert in der Meiose der Bäckerhefe die Strangaustauschreaktion und die Ausbildung der D-Loop-Struktur (Übersicht in San Filippo *et al.* 2008). Auch in Arabidopsis ist die Interaktion der jeweiligen Homologen MND1 und HOP2, sowie deren meiotischen Funktion beschrieben worden (Domenichini *et al.* 2006; Kerzendorfer *et al.* 2006; Panoli *et al.* 2006; Vignard *et al.* 2007; Dean *et al.* 2009; Stronghill *et al.* 2010). MND1-HOP2 fördern dabei die Homologiesuche nach der Ausbildung der präsynaptischen Filamente (Vignard *et al.* 2007). Als Mediatorprotein zur Rad51- und Dmc1-vermittelten Rekombination dient in der Meiose der Bäckerhefe Rad52, zu dem bisher kein Homolog in Arabidopsis gefunden werden konnte. Im Menschen nimmt diese Funktion das Protein BRCA2 ein (Übersicht in Liu und Heyer 2011). Eine genaue Beschreibung der BRCA2-Proteine von Mensch und Arabidopsis wird in Kapitel 1.4.2 gegeben.

1.3.3. Die Non-Crossover / Crossover-Entscheidung

In der Bäckerhefe, in der 50 % der Doppelstrangbrüche zu Crossover-Produkten werden, werden die meisten oder eventuell auch alle Non-Crossover-Produkte über den SDSA-Weg der homologen Rekombination gebildet (Börner *et al.* 2004; Andersen und Sekelsky 2010; siehe Abbildung 3 F-I). Diese Entscheidung wird schon bei der Bildung stabiler Einzelstrang-invasionsmediate getroffen. Die Intermediate, aus denen dann doppelte Holliday-Junctions gebildet werden, werden später als Crossover aufgelöst (Allers und Lichten 2001, Youds und Boulton 2011). Aus den ca. 150 Doppelstrangbrüchen, die im frühen Leptotän eingeführt werden, werden letztlich in Arabidopsis nur ca. 10 Crossover gebildet (Sanchez-Moran *et al.* 2007). Dies bedeutet, dass ca. 95 % der Intermediate zu Non-Crossover-Produkten prozessiert werden. Dies geschieht auch in Arabidopsis hauptsächlich über den SDSA-Weg, bei dem der invadierte Strang nach Verlängerung wieder herausgelöst wird und mit dem resektierten Strang der anderen Seite des Doppelstrangbruchs paart (siehe Kapitel 1.2.2).

Um die korrekte Aufteilung der Chromosomen zu gewährleisten wird in den meisten Spezies mindestens ein Crossover-Ereignis pro Chromosomenpaar benötigt (Jones 1984; Jones und Franklin 2006; Shinohara *et al.* 2008). Im Arabidopsis-Wildtyp werden zwischen 8 und 12 Chiasmata beobachtet (Higgins *et al.* 2004). Analysen der Verteilung von Crossovern über die Chromosomen ließ erkennen, dass diese nicht statistisch verteilt sind, sondern dass die Bildung eines Crossovers die Bildung eines weiteren in unmittelbarer Nähe verhindert: die

Crossover zeigen Interferenz (Hillers 2004; Jones und Franklin 2006). Diese werden als Crossover der Klasse I bezeichnet. Es existiert allerdings noch ein zweiter, unabhängiger Weg der Crossover-Bildung, dessen Produkte keiner Interferenz-sensitiven Verteilung unterworfen sind (de los Santos *et al.* 2003). Die über diesen Weg entstehenden Crossover sind statistisch verteilt und werden als Crossover der Klasse II bezeichnet. In *Arabidopsis* wurde die Existenz des Klasse II Crossover-Wegs anhand genetischer Analysen postuliert und durch das Ausschalten eines Schlüsselproteins des Klasse I-Crossover-Wegs experimentell bestätigt (Copenhaver *et al.* 2002; Higgins *et al.* 2004).

Die Verteilung zwischen Interferenz-sensitiven und Interferenz-insensitiven Crossovern ist stark unterschiedlich zwischen den verschiedenen Organismen (Übersicht in Berchowitz und Copenhaver 2010; Youds und Boulton 2011): Während in der Bäckerhefe ca. 15 % der Crossover zur Klasse II gehören, so sind dies in *Arabidopsis thaliana* ca. 10 %. In der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* zeigen alle Crossover keine Interferenz, sind also Klasse II Crossover. Im Fadenwurm *C. elegans* hingegen zeigen alle Crossover Interferenz, es existieren nur Crossover der Klasse I.

1.3.4. Die Bildung Interferenz-sensitiver Crossover

Die ZMM-Proteine, eine Abkürzung für die Proteine Zip1/Zip2/Zip3/Zip4, Msh4/Msh5 und Mer3 wurden in der Bäckerhefe als Proteine beschrieben, die in der Rekombination und der Ausbildung des Synaptonemalen Komplexes gemeinsame Funktionen erfüllen (eine Übersicht findet sich in Lynn *et al.* 2007). Sie sind essentiell für die Bildung Interferenz-sensitiver Crossover (Klasse I COs) und die Ausbildung des Synaptonemalen Komplexes (Börner *et al.* 2004). Sie werden in verschiedene Untergruppen eingeteilt, darunter die Untergruppe I mit den Proteinen Mer3, Msh4 und Msh5. Msh4 und Msh5 bilden dabei ein Heterodimer und stabilisieren frühe Rekombinationsintermediate und auch doppelte Holliday-Junctions (Lynn *et al.* 2007). Eine genauere Beschreibung dazu findet sich in Kapitel 1.4.3.

Mer3 aus der Bäckerhefe wurde als Helikase charakterisiert, die Intermediate der Einzelstranginvasion stabilisiert, indem sie die Rad51-vermittelte DNA-Heteroduplex-Verlängerung unidirektional stimuliert (Nakagawa und Ogawa 1999; Nakagawa *et al.* 2001; Nakagawa und Kolodner 2002a; Nakagawa und Kolodner 2002b; Mazina *et al.* 2004). Auch in anderen Organismen wurden Mer3-Homologe identifiziert, darunter im Menschen, in *Arabidopsis* und in Reis (Chen *et al.* 2005; Mercier *et al.* 2005; Tanaka *et al.* 2006; Wang *et al.* 2009). In *Arabidopsis* zeigten *mer3*-Mutanten eine stark reduzierte Fertilität und einen Defekt in der Crossover-Bildung, es fanden sich bis zu 75 % weniger COs. Allerdings wurden

keine Synapsisdefekte in den *mer3*-Mutanten beschrieben (Chen *et al.* 2005; Mercier *et al.* 2005).

Zip1 aus der Bäckerhefe bildet das transversale Filament des Synaptonemalen Komplexes (Sym *et al.* 1993). Zip1 ist auch in die Bildung von Klasse I Crossovern involviert (Storlazzi *et al.* 1996). In Arabidopsis wurden zwei Zip1-Homologe identifiziert: ZYP1A und ZYP1B, die als Heterodimer – im Weiteren als ZYP1 bezeichnet – vorkommen (Higgins *et al.* 2005). ZYP1-Foci konnten schon im Leptotän, vor der Bildung des Synaptonemalen Komplex, nachgewiesen werden. Ausgehend von ca. 30 Initiationsstellen im Zygotän zeigte sich die Ausbildung von ZYP1-Achsen entlang bzw. zwischen den sich annähernden Chromosomenachsen, die im Pachytän mit der vollständigen Synapsis abgeschlossen war. Neben der Beteiligung an der Ausbildung des Synaptonemalen Komplexes wurde auch für ZYP1 in Arabidopsis eine Beteiligung an der Crossover-Bildung bzw. in der Crossover-Kontrolle zur Vermeidung aberranter Rekombination beschrieben (Higgins *et al.* 2005).

Auch der Proteinkomplex RPA aus der Bäckerhefe ist in die Bildung von Crossovern der Klasse I involviert, indem er Rad52-vermittelte Strangpaarung und die des zweiten Doppelstrangbruchendes fördert (Sugiyama *et al.* 1997; Sugiyama *et al.* 2006). Auch Mutanten in Arabidopsis zeigen eine Beteiligung des RPA-Komplexes in diesem Weg auf (Osman *et al.* 2009). RPA fungiert hierbei nach MSH4 und vor den MutL-Homologen

Eukaryotische MutL-Homologe (MLH1, MLH2 und MLH3) sind in die Mismatchreparatur und in die meiotische Rekombination involviert (Polosina und Cupples 2010). In Arabidopsis haben MLH1 und MLH3 eine meiotische Rolle (Jean *et al.* 1999; Franklin *et al.* 2006; Jackson *et al.* 2006; Dion *et al.* 2007). MLH1 bzw. MLH3-Foci co-lokalisieren im Pachytän und bilden jeweils ca. 9 Foci, und markieren damit die Crossover der Klasse I. In *mlh1*- bzw. *mlh3*-Mutanten wurde die Ausbildung der Synapsis und von MSH4-Foci beobachtet. Es wurde daher postuliert, dass MLH1-MLH3 die doppelte Holliday-Junction in eine Konformation bringt, die die Resolution als Crossover garantiert (Franklin *et al.* 2006).

Auch für Zip3 und Zip4-Homologe in Arabidopsis konnte eine meiotische Funktion in der Bildung von Klasse I Crossovern postuliert werden (Chelysheva *et al.* 2007; Osman *et al.* 2011). Außerdem wurden in Arabidopsis zwei Proteine identifiziert, die möglicherweise als Heterodimer eine Endonuklease-Funktion ausüben könnten und epistatisch zu den ZMM Proteinen sind: PTD und SHOC1 (Wijeratne *et al.* 2006; Macaisne *et al.* 2008; Macaisne *et al.* 2011). Diese könnten an der Resolution von doppelten Holliday-Junctions als Crossover der Klasse I beteiligt sein.

1.3.5. Die Bildung Interferenz-insensitiver Crossover

Die Crossover der Klasse II aus der Bäckerhefe werden zumindest teilweise vom Mus81/Mms4 Heterodimer gebildet, das als Endonuklease Rekombinationsintermediate zu Crossovern umsetzen kann (de los Santos *et al.* 2003; Börner *et al.* 2004). Mus81/Mms4 agiert bei Ausfall des RecQ-Homologs Sgs1 als Absicherung für die Prozessierung aberranter Strukturen (Oh *et al.* 2008). Eventuell ist auch der Weg zur Bildung von Crossovern der Klasse II eine Möglichkeit der Prozessierung aberranter Strukturen, die in anderen Wegen entstehen (Osman *et al.* 2011). Für die homologen Heterodimere MUS81/EME1A und MUS81/EME1B aus Arabidopsis konnte *in vitro* das Schneiden von intakten Holliday-Junctions und Holliday-Junctions mit Einzelstrangbruch gezeigt werden (Geuting *et al.* 2009). MUS81 konnte auch in der Meiose nachgewiesen werden und ist dort auch für die Bildung von Crossovern der Klasse II verantwortlich (Berchowitz *et al.* 2007; Higgins *et al.* 2008a). Allerdings müssen weitere Proteine maßgeblich involviert sein, da auch ein Knockout von MSH4 und MUS81 in Arabidopsis nicht zu einer vollständigen Eliminierung aller Crossover führt.

1.3.6. Die Bildung von Non-Crossover-Produkten über Dissolution

In der somatischen Rekombination können doppelte Holliday-Junctions nicht nur über die Resolution durch Nukleasen aufgelöst, sondern auch über die sogenannte Dissolution durch den RTR-Komplex ausschließlich in Non-Crossover-Produkte überführt werden (Übersicht in Heyer *et al.* 2010; Abbildung 3 N-O). Mutanten von RTR-Proteinen in Arabidopsis zeigten neben somatischen HR-Defekten auch schwere meiotische Defekte (Hartung *et al.* 2008; eine ausführliche Beschreibung findet sich in Kapitel 1.4.4). Daraus kann geschlossen werden, dass die Dissolution doppelter Holliday-Junctions in der Meiose von *Arabidopsis thaliana* eine essentielle Rolle einnimmt. Dies kann dadurch bedingt sein, dass in der Bäckerhefe 50 % der Doppelstrangbrüche als Crossover aufgelöst werden, in Arabidopsis hingegen nur 5 %. Als weiteres Indiz dafür kann die Beobachtung gelten, dass die Anzahl der späten MSH4-Foci, die mit der Bildung Interferenz-sensitiver Crossover assoziiert sind, ca. 30 beträgt, die Zahl der Crossover aber nur ca. 10. Also werden ca. 20 der MSH4-markierten späten Intermediate letztlich nicht zu Crossovern aufgelöst (Osman *et al.* 2011). Der genaue Zusammenhang zwischen der Bildung Interferenz-insensitiver Crossover und der Dissolution doppelter Holliday-Junctions ist allerdings noch nicht definiert worden.

1.3.7. Der Zusammenhang zwischen meiotischer Rekombination und Synapsis homologer Chromosomen

Meiotische Rekombination und Synapsis laufen in *Arabidopsis thaliana* parallel und koordiniert ab. Im Leptotän werden die Chromatinachsen gebildet, dies führt zu einer Anordnung des Chromatins in Schleifen, die an der Achse organisiert sind (siehe Abbildung 2; Kleckner 2006). Kurz vorher oder parallel dazu werden Doppelstrangbrüche eingeführt.

Dabei agiert z.B. das achsenassoziierte Protein ASY1 aus *Arabidopsis* als Schnittstelle zwischen den Chromatinachsen und der Proteinmaschinerie der homologen Rekombination (Sanchez-Moran *et al.* 2007). ASY1 aus *Arabidopsis* wurde als Homolog zu Hop1 der Bäckerhefe identifiziert (Ross *et al.* 1997; Caryl *et al.* 2000; Armstrong *et al.* 2002). Hop1 aus der Bäckerhefe und auch ASY1 aus *Arabidopsis* sind mit der Chromatinachse bzw. den lateralen Elementen des Synaptonemalen Komplexes assoziiert. Fällt ASY1 in *Arabidopsis* aus, so führt dies nicht nur zu einem asynaptischen Phänotyp, sondern auch zu einer dramatischen Reduktion der Crossover-Frequenz (Sanchez-Moran *et al.* 2001). ASY1 koordiniert die Aktivität von DMC1 und ist somit essentiell für die erfolgreiche Stranginvasion in das homologe Chromosom (Sanchez-Moran *et al.* 2007; Sanchez-Moran *et al.* 2008). Auch ZYP1 aus *Arabidopsis* ist als zentrales Element des Synaptonemalen Komplex in die meiotische Rekombination involviert (siehe Kapitel 1.3.4). Strukturelle Prozesse sind also entscheidend für den korrekten Ablauf der meiotischen Rekombination.

Allerdings sind auch die Initiation und das Fortschreiten der homologen Rekombination für die Ausbildung der Synapsis entscheidend – Mutanten von Proteinen, die in der frühen Phase der homologen Rekombination involviert sind, wie z.B. RAD51, zeigen asynaptische Phänotypen. In Mutanten von MSH4 oder auch MLH1 wird allerdings Synapsis beobachtet (siehe Kapitel 1.3.4). Daraus kann geschlossen werden, dass die Rekombination bis zu einem gewissen Punkt fortschreiten muss, um die korrekte Ausbildung der Synapsis zu gewährleisten. Dieser Punkt scheint in *Arabidopsis* nach der Stranginvasion, jedoch vor der Bildung stabiler Rekombinationsintermediate zu liegen.

1.4. Ausgewählte Proteine der somatischen und meiotischen Rekombination

1.4.1. Die Rekombinasen RAD51 und DMC1

In Eukaryoten wird die Homologie-Suche und Stranginvasion in der homologen Rekombination vom RecA-Paralog RAD51 durchgeführt (Sung 1994; Übersicht in Li und Heyer 2008; San Filippo *et al.* 2008; Heyer *et al.* 2010; Holthausen *et al.* 2010; Holloman 2011). Dabei bilden sich als katalytisch aktive Form des RAD51 helikale Nukleoproteinfilamente. Um polymerisieren zu können, muss RAD51 ATP binden. ATP-Hydrolyse wiederum führt zur Auflösung des RAD51-Filaments. Um das Einzelstrangbindeprotein RPA von einzelsträngiger DNA zu verdrängen und eine RAD51-Filamentbildung zu ermöglichen, bedarf es der Aktivität eines Mediatorproteins. Im Menschen ist dies BRCA2, in der Bäckerhefe RAD52 (Übersicht in Liu und Heyer 2011). RAD51 wird proliferativen Geweben exprimiert und ist auch in die Reparatur replikationsassoziierter DNA-Brüche involviert (Benson *et al.* 1994; Baumann *et al.* 1996; Gupta *et al.* 1997). Nach Induktion von DNA-Schäden bilden sich RAD51-Foci im Zellkern (Haaf *et al.* 1995; Li und Maizels 1997; Tarsounas *et al.* 2003; van Veelen *et al.* 2005). RAD51 ist ein essentielles Protein für die Zellproliferation: der Knockout von *RAD51* in Mäusen führt zu früher embryonaler Letalität (Lim und Hasty 1996; Tsuzuki *et al.* 1996). In verschiedenen Tumorzelllinien konnte außerdem eine Überexpression von RAD51 beobachtet werden und diese wurde mit einer erhöhten Strahlenresistenz assoziiert (Raderschall *et al.* 2002a; Raderschall *et al.* 2002b). Die Co-Lokalisation von RAD51 in der frühen meiotischen Prophase in Spermatozyten von Mäusen und im Menschen mit anderen Rekombinationsproteinen zeigte die Beteiligung von RAD51 an der meiotischen Rekombination (Haaf *et al.* 1995; Rockmill *et al.* 1995; Barlow *et al.* 1997).

DMC1 ist das Meiose-spezifische Paralog von RAD51 (Bishop *et al.* 1992; Übersicht in Masson und West 2001; Shinohara und Shinohara 2004; Kagawa und Kurumizaka 2010). In Mäusen führt der Knockout von *DMC1* zu Sterilität, Spermatozyten zeigen schwere meiotische Defekte wie Asynapsis bzw. Verknüpfungen zwischen nicht-homologen Chromosomen und einen Arrest in der meiotischen Prophase (Pittman *et al.* 1998; Yoshida *et al.* 1998). Auch DMC1 zeigt *in vitro* die Fähigkeit zum Strangaustausch und der Bildung einer D-Loop-Struktur, abhängig von ATP (Masson *et al.* 1999; Gupta *et al.* 2001; Hong *et al.* 2001). Mutantanalyse in der Bäckerhefe zeigten die unterschiedlichen Rollen von RAD51 und DMC1 in der Meiose auf: *Dmc1* vermittelt Interhomolog-Rekombination, die speziell in der Meiose für die Ausbildung von Chiasmata wichtig ist (Schwacha und Kleckner 1997).

Mutanten beider Rekombinasen in *Arabidopsis thaliana* sind somatisch unauffällig, aber homozygot steril und zeigen schwere meiotische Defekte (Couteau *et al.* 1999; Li *et al.* 2004). Während in der *dmc1*-Mutante keine Bivalentbildung beobachtet werden konnte, so waren in der *rad51-1*-Mutante zusätzlich schwere Chromosomenfragmentierungen zu beobachten. Eine Doppelmutante beider Rekombinasen zeigte den *rad51-1*-Phänotyp (Vignard *et al.* 2007). Dies kann dadurch erklärt werden, dass DMC1 für die Invasion in das homologe Chromosom verantwortlich ist, RAD51 in der Meiose DMC1 zeitlich nachfolgt und auf dem zweiten Einzelstrang polymerisiert. Fällt DMC1 aus, so sorgt RAD51 für eine Invasion in das Schwesterchromatid – es werden keine Crossover gebildet und es erfolgt keine Bivalentbildung. Fällt RAD51 aus, so werden Rekombinationsintermediate nicht weiter prozessiert und es kommt zu schweren Fragmentierungen.

1.4.2. Das Mediatorprotein BRCA2

Im Menschen sind Mutationen in den Brustkrebs-assoziierten-Genen BRCA1 und BRCA2 mit einem 80 % höheren Risiko für das Auftreten von Brustkrebs verbunden (O'Donovan und Livingston 2010). Die Krebsentstehung wird dabei durch Defekte in den rekombinationsvermittelten DNA-Reparaturwegen begünstigt. BRCA2 wurde in einem Screening nach Brustkrebsprädispositionsgenen mit hoher Penetranz identifiziert (Wooster *et al.* 1994; Wooster *et al.* 1995) und ist neben der wichtigen Rolle in der DNA-Reparatur über HR außerdem noch in andere zelluläre Prozesse, wie Zellzyklusregulation und Transkriptionskontrolle involviert (Yoshida und Miki 2004; Boulton 2006). BRCA2-defekte Zellen aus Maus und Mensch zeigen genomische Instabilität und akkumulieren Chromosomenbrüche und radiale Chromosomen (Suzuki *et al.* 1997; Patel *et al.* 1998; Yu *et al.* 2000; Moynahan *et al.* 2001; Tutt *et al.* 2001).

BRCA2 interagiert mit der Rekombinase RAD51 (Sharan *et al.* 1997; Wong *et al.* 1997; Chen *et al.* 1998a; Chen *et al.* 1998b; Katagiri *et al.* 1998; Marmorstein *et al.* 1998). Die Interaktion wird über sogenannte BRC-Wiederholungen im mittleren Bereich des Proteins (Wong *et al.* 1997; Chen *et al.* 1998b; Chen *et al.* 1999; Galkin *et al.* 2005) und die TR2-Region im C-Terminus vermittelt (Mizuta *et al.* 1997; Sharan *et al.* 1997; Esashi *et al.* 2005). Die Interaktion von BRCA2 mit RAD51 über die TR2-Region wird über posttranslationale Modifikation von BRCA2 moduliert (Esashi *et al.* 2005; Davies und Pellegrini 2007; Esashi *et al.* 2007; Thorslund und West 2007). Eine Phosphorylierung unterbindet die Interaktion von BRCA2 mit RAD51-Multimeren und kann damit eine Blockade der HR beim Eintritt in die Mitose bzw. eine Aktivierung der HR nach DNA-Schädigung regulieren (Thorslund und West 2007). BRCA2 spielt eine essentielle Rolle für die Bildung von RAD51-Foci nach Induktion von DNA-Schäden und es konnte außerdem eine Co-Lokalisierung von Foci beider Proteine nach radioaktiver Bestrahlung festgestellt werden (Sharan *et al.* 1997; Yuan *et al.* 1999; Tarsounas

et al. 2004). In *in vitro*-Studien konnte kürzlich gezeigt werden, dass BRCA2 die Bildung von RAD51-Filamenten auf RPA-ummantelten DNA-Einzelsträngen fördert. Damit wurde die Rolle von BRCA2 als Mediator der RAD51-vermittelten Stranginvasion bestätigt (Jensen *et al.* 2010; Liu *et al.* 2010a; Thorslund *et al.* 2010). In der Bäckerhefe ist kein Homolog zu BRCA2 vorhanden, hier übernimmt das Protein Rad52 die Mediatorfunktion (Übersicht in Mortensen *et al.* 2009). In Säugern wurde ein RAD52-Homolog beschrieben, das hier eine Funktion in der Strangpaarung nach der Ausbildung der D-Loop-Struktur einnimmt (Übersicht in Liu und Heyer 2011).

Die Erforschung der meiotischen Rolle von BRCA2 im Menschen oder anderen Säugern ist schwierig, da ein vollständiger Ausfall von BRCA2 zu embryonaler Letalität führt (Connor *et al.* 1997; Suzuki *et al.* 1997). Mäuse bzw. Ratten, die eine verkürzte Version des jeweiligen BRCA2-Proteins oder HsBRCA2 exprimierten, waren lebensfähig, aber steril (Connor *et al.* 1997; Sharan *et al.* 2004; Cotroneo *et al.* 2007). Es konnte ein Abbruch der Meiose nach der frühen Prophase I und Synapsisdefekte beobachtet werden. Außerdem konnten in diesen Zellen keine RAD51- oder DMC1-Foci detektiert werden. In Säugern konnte damit die Rolle von BRCA2 als Mediator der Stranginvasion auch in der Meiose bestätigt werden.

In Arabidopsis konnten zwei BRCA2-Homologe, im Folgenden als BRCA2A und BRCA2B bezeichnet, identifiziert werden (Siaud *et al.* 2004; Übersicht in Trapp *et al.* 2011). Die BRCA2-Proteine zeigen 94,5% Identität und im Vergleich zum menschlichen Protein sind 21 % der Aminosäuren identisch. Für beide konnten in *in vitro*-Interaktionsanalysen eine Interaktion mit RAD51 und seinem meiotischen Paralog DMC1 aus Arabidopsis nachgewiesen werden (Siaud *et al.* 2004; Dray *et al.* 2006). Der BRCA2-RAD51-Komplex konnte kürzlich sogar *in planta* bestätigt werden (Wang *et al.* 2010). Es wurden verschiedene Studien zum Einfluss der BRCA2-Proteine auf die somatische DNA-Reparatur durchgeführt (Abe *et al.* 2009; Wang *et al.* 2010; Seeliger *et al.* 2011). Beide BRCA2-Homologe sind in die somatische DNA-Reparatur involviert, die Doppelmutante *brca2* zeigte eine starke Sensitivität gegenüber dem crosslinkenden Agens Mitomycin C. Außerdem konnte eine dramatische Reduktion der Rate replikationsassoziierter und Doppelstrangbruch-induzierter homologer Rekombination beschrieben werden (Seeliger *et al.* 2011). BRCA2A wurde außerdem in einem Screen für Proteine identifiziert, die mit der erworbenen systemischen Resistenz (SAR), einer induzierbaren Immunantwort von Pflanzen, assoziiert sind (Wang *et al.* 2010). BRCA2A agiert hierbei als Transkriptionsregulator im Komplex mit RAD51 und ist wichtig für die Expression von SAR-Schlüsselgenen.

Erste Untersuchungen von RNAi-Linien, in denen beide *BRCA2*-Gene stillgelegt werden sollten, zeigten deren Beteiligung in der Meiose von Arabidopsis (Siaud *et al.* 2004). Die Linien zeigten partielle Sterilität mit Defekten in der Synapsis und Chromosomenfragmentierung. Die Rollen beider BRCA2-Homologe in der Meiose scheinen redundant zu sein, da Einzelmutanten beider Proteine in Arabidopsis fertil, die *brca2*-Doppelmutante jedoch steril ist (Seeliger *et al.* 2011). Zusätzlich zu einem asynaptischen Phänotyp und schwerer Chromosomenfragmentierung in der Meiose von Pollenmutterzellen konnte eine

Störung der Entwicklung des weiblichen Gametophyten beschrieben werden. Die Defekte in der Meiose von Pollenmutterzellen waren hierbei den für die *rad51-1*-Mutante beschriebenen sehr ähnlich, aber unterschiedlich zu den Defekten in *dmc1*-Mutanten (Couteau *et al.* 1999; Li *et al.* 2004; Siaud *et al.* 2004; Seeliger *et al.* 2011).

1.4.3. Das Heterodimer MSH4/MSH5

Die MutS-Homologe Msh4 und Msh5 aus der Bäckerhefe sind nicht in der Mismatch-reparatur involviert, sondern spielen als Heterodimer eine Schlüsselrolle in der Förderung der Crossover-Bildung in der Meiose (Ross-Macdonald und Roeder 1994; Hollingsworth *et al.* 1995). Diese Rolle nimmt das MSH4/MSH5-Dimer auch in anderen Eukaryoten, wie *C. elegans*, der Maus und im Menschen ein (Bocker *et al.* 1999; de Vries *et al.* 1999; Zalevsky *et al.* 1999; Kelly *et al.* 2000; Kneitz *et al.* 2000). Mutanten von MSH4 oder MSH5 in der Maus zeigen eine komplette Abwesenheit von Crossovers und keine Synapsis bzw. Bivalentbildung (de Vries *et al.* 1999; Edelman *et al.* 1999; Kneitz *et al.* 2000). Eine biochemische Charakterisierung des menschlichen MSH4/MSH5-Dimers zeigte, dass Stranginvasionsintermediate stabilisiert werden (Snowden *et al.* 2004). In *in vitro*-Assays wurde gezeigt, dass MSH4/MSH5 an Holliday-Junctions, aber nicht an Mismatches oder Gabelsubstrate bindet, jedoch auch an HJ-Vorläuferstrukturen, wie D-Loop-Intermediate. Das Dimer formt dabei unter ATP-Bindung eine Art Klammer um die homologe Duplex-DNA (siehe Abbildung 4). Diese Klammer kann an den Doppelsträngen entlang gleiten und so Platz für ein weiteres MSH4/MSH5-Dimer schaffen. Damit werden sich verlängernde invadierte Stränge stabilisiert bis hin zu Ausbildung einer doppelten Holliday-Junction, die dann wiederum zum Crossover oder Non-Crossover gelöst werden kann. In der Maus konnte zudem eine Interaktion von MSH4 mit den Rekombinasen RAD51 und DMC1 nachgewiesen werden (Neyton *et al.* 2004). Für Säugetiere wurde daher eine Rolle für MSH4/MSH5 in einer frühen Phase vor der Entscheidung zur Crossover- bzw. Non-Crossover-Bildung postuliert, die auch die Bildung von NCOs aus MSH4/MSH5-stabilisierten Intermediaten einschließt (Baudat und de Massy 2007). Dieser Unterschied zwischen Säugern und Bäckerhefe kann in der Tatsache begründet sein, dass, wie bereits erwähnt, in der Bäckerhefe viele Crossover gebildet werden, es aber in Säugern einen großen Überschuss an frühen Rekombinationsintermediaten im Vergleich zur vergleichsweise geringen Zahl von Crossovers gibt (Kneitz *et al.* 2000; Fung *et al.* 2004; de Boer *et al.* 2006). Allerdings konnte MSH4 auch in späteren Stadien zytologisch nachgewiesen werden und es wird auch eine Rolle in der dHJ-Prozessierung postuliert, da MSH4 mit dem Crossover-Markerprotein MLH1 in der Maus koloalisiert werden konnte (Moens *et al.* 2002).

Auch in *Arabidopsis* wurden Homologe zu den Proteinen MSH4 und MSH5 identifiziert (Higgins *et al.* 2004; Higgins *et al.* 2008b). Beide Mutanten zeigten eine stark eingeschränkte

Fertilität und die Crossover-Bildung ist auf ca. 15% reduziert. Die verbleibenden Chiasmata sind Interferenz-insensitiv. Allerdings ist die Synapsis in beiden Mutanten nicht gravierend eingeschränkt. Die Ergebnisse aus beiden Mutanten zeigen, dass auch in Arabidopsis MSH4 und MSH5 als Heterodimer in die Bildung Interferenz-sensitiver Crossover (Klasse I) involviert sind. Die Ausbildung normaler Synapsis in den meisten Meiosestadien der Mutanten deutet darauf hin, dass ein Signal zur Ausbildung der Synapsis in Arabidopsis nicht von der korrekten Lokalisation von MSH4/MSH5 abhängt, jedoch ist das Fortschreiten der Meiose in beiden Mutanten verzögert, was auf einen Intra-Prophase I-Checkpoint hinweist. Wie in Säugetieren, so konnte auch in Arabidopsis festgestellt werden, dass die Zahl der frühen MSH4 bzw. MSH5-Foci die der Crossover bei weitem übersteigt (Higgins *et al.* 2004; de Boer *et al.* 2006; Higgins *et al.* 2008b). Daher muss davon ausgegangen werden, dass auch in Arabidopsis eine große Zahl der MSH4/MSH5-markierten frühen Rekombinationsintermediate als Non-Crossover aufgelöst werden.

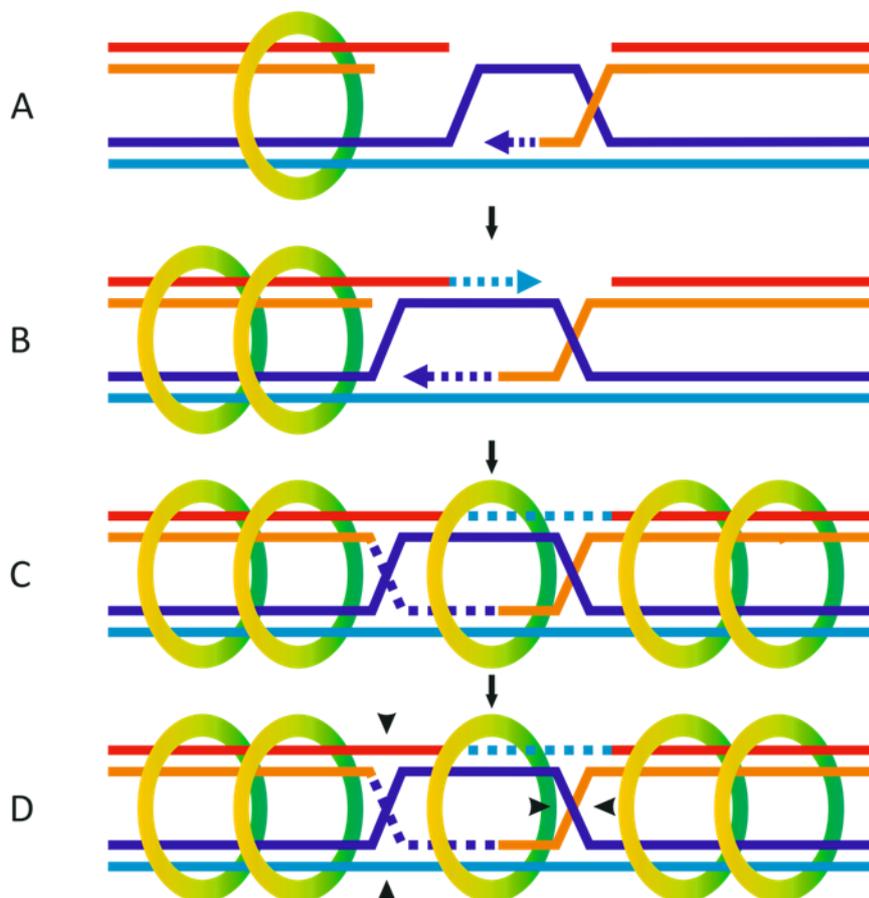


Abbildung 4: Das MSH4/MSH5-Heterodimer stabilisiert Rekombinationsintermediate. (A) Das MSH4/MSH5-Heterodimer bindet als Klammer um die homologe Duplex-DNA angrenzend zu frühen Rekombinationsintermediaten, in denen ein Einzelstrang in einen homologen Doppelstrang invadiert ist und damit eine D-Loop-Struktur ausgebildet hat. (B) Die Klammer kann dann an der Duplex-DNA weiter gleiten und Platz für ein weiteres Dimer schaffen. Somit wird der sich erweiternde D-Loop stabilisiert. (C) Mehrere der MSH4/MSH5-Klammern können so die Bildung einer doppelten Holliday-Junction und (D) deren Resolution als Crossover fördern. Neu synthetisierte Stränge sind gestrichelt dargestellt, Pfeilspitzen deuten das Schnittmuster zur Resolution der doppelten Holliday-Junction zum Crossover an (Abbildung verändert nach Snowden *et al.* 2004).

1.4.4. RecQ-Helikase, TOP3 α und RMI1-RMI2: Das Dissolvasom

RecQ-Helikasen spielen eine essentielle Rolle für den Erhalt der Genomstabilität und sind in allen Reichen des Lebens konserviert (eine Übersicht findet sich in Bachrati und Hickson 2008; Vindigni und Hickson 2009; Bernstein *et al.* 2010; Rezazadeh 2011). So ist der Ausfall von dreien der fünf RecQ-Homologen im Menschen jeweils mit Erbkrankheiten verbunden, denen eine erhöhte Krebsdisposition gemein ist. Mutationen in der RecQ-Helikase BLM führen zum Bloom-Syndrom, das auf zellulärer Ebene mit einer erhöhten Anzahl an Chromosomenbrüchen und Schwesterchromatidaustauschen verbunden ist (German *et al.* 1965). BLM interagiert mit der Topoisomerase TOP3 α und dem Strukturprotein RMI1 unter Bildung des sogenannten RTR-Komplex, der doppelte Holliday-Junctions zu Non-Crossover-Produkten auflösen kann (Raynard *et al.* 2006; Bussen *et al.* 2007; Mankouri und Hickson 2007; Raynard *et al.* 2008; Hoadley *et al.* 2010). Dabei werden die Kreuzungspunkte beider Holliday-Junctions durch die RecQ-Helikase aufeinander zugeschoben und letztlich in eine Hemicatenanstruktur überführt, welche durch die Topoisomerase gelöst werden kann (Abbildung 3). Als weitere Komponente des RTR-Komplex wurde RMI2 identifiziert, das mit RMI1 interagiert (Singh *et al.* 2008; Xu *et al.* 2008). Der RMI1/RMI2-Komplex ist essentiell für die Stabilität des RTR-Komplexes und dessen Lokalisation an rekombinogene DNA-Strukturen und stimuliert die Dissolutionsaktivität von BLM/TOP3 α . Der RTR-Komplex ist in vielen Organismen konserviert, darunter auch in der Bäckerhefe, in der die einzige RecQ-Helikase Sgs1 mit der Topoisomerase Top3 und dem Bäckerhefe-Homolog Rmi1 interagiert (eine Übersicht findet sich in Ashton *et al.* 2011). Eine weitere Aktivität von Sgs1 bzw. BLM in Zusammenarbeit mit der Nuklease Dna2 ist die Verlängerung der Einzelstrangüberhänge bei der Doppelstrangbruch-Resektion, auch diese Aktivität wird von Top3 α -Rmi1 stimuliert (Cejka *et al.* 2010; Longhese *et al.* 2010; Niu *et al.* 2010).

Studien in der Bäckerhefe zeigten, dass Sgs1, zusammen mit Top3 und Rmi1 meiotischen COs entgegenwirkt und als Gegenspieler zu den Co-Faktoren Msh4/Msh5 und Mlh1/Mlh3 wirkt (Gangloff *et al.* 1999; Wang und Kung 2002; Rockmill *et al.* 2003; Jessop *et al.* 2006; Oh *et al.* 2007; Jessop und Lichten 2008; Oh *et al.* 2008; Amin *et al.* 2010). Sgs1 ist allerdings auch in die meiotische Doppelstrangbruchresektion involviert (Manfrini *et al.* 2010). Auch für die mammalische Helikase BLM konnten meiotische Funktionen beschrieben werden (Holloway *et al.* 2010). Konditionale BLM-Knockout-Mäuse zeigten Synapsisdefekte und eine erhöhte Zahl an Chiasmata. Die Lokalisation der Rekombinationsmarker RAD51, MSH4 und MLH1 war durch den Ausfall von BLM allerdings nicht verändert.

Auch in Arabidopsis konnten Homologe zu den Proteinen des RTR-Komplexes identifiziert werden. Die RecQ-Helikase RECQ4A konnte über verschiedene konservierte Interaktionen als Homolog zum menschlichen BLM identifiziert werden und ist daher wahrscheinlich auch die RecQ-Helikase des RTR-Komplexes in Arabidopsis (Hartung *et al.* 2007a; Hartung *et al.* 2008). Zudem konnten Homologe zu TOP3 α und RMI1 identifiziert werden (Chelysheva *et al.*

2008; Hartung *et al.* 2008). Einzelmutanten von TOP3 α , RMI1 und RECQ4A zeigen jeweils stark verringerte Raten replikationsabhängiger homologer Rekombination und Hypersensitivität gegenüber dem Crosslinker Cisplatin und dem methylierenden Agens Methylmethansulfonat (MMS). Der RTR-Komplex ist also auch in *Arabidopsis* eine wichtige Komponente der somatischen DNA-Reparatur. Während in einer *recq4a*-Mutante in *Arabidopsis thaliana* eine verringerte Fertilität mit Telomerbrücken und selten auftretenden Fragmentierungen in der Meiose von Pollenmutterzellen beschrieben wurde (Higgins *et al.* 2011) sind *top3 α -2*- und *rmi1*-Mutanten homozygot steril (Chelysheva *et al.* 2008; Hartung *et al.* 2008). In der Meiose von Pollenmutterzellen konnten in Mutanten beider Gene nach augenscheinlich erfolgter Synapsis schwere Chromosomenfragmentierung und Chromosomenbrücken in der Anaphase I beschrieben werden. Diese drastischen Defekte führten zu einem Abort der Meiose nach der Meiose I. Der beschriebene Phänotyp ist abhängig von der Doppelstrangbruchinduktion und wird durch eine zusätzliche *rad51*-Mutation aufgehoben (Hartung *et al.* 2008). Die unterschiedlichen Auswirkung des Ausfall verschiedener Mitglieder des RTR-Komplexes kann damit erklärt werden, dass eine andere der sieben RecQ-Helikasen in *Arabidopsis* die Funktion von RECQ4A im RTR-Komplex während der Meiose übernehmen kann, nicht jedoch deren Rolle in der Erhaltung der Telomere (Higgins *et al.* 2011). Trotzdem zeigt der drastische Phänotyp von *top3 α* - und *rmi1*-Mutanten die große Relevanz des Dissolutionswegs in der Meiose von *Arabidopsis thaliana* auf.

1.4.5. Die Antirekombinase RTEL1

RTEL1 wurde in Säugetieren als eine Helikase zur Regulation des Telomerstoffwechsels identifiziert (Ding *et al.* 2004; Barber *et al.* 2008). RTEL1 wirkt zudem als Antirekombinase, indem es D-Loops aufwindet und damit den SDSA-Weg der homologen Rekombination fördert (Barber *et al.* 2008; Uringa *et al.* 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in RTEL1 im Menschen mit einer erhöhten Anfälligkeit für Gliome assoziiert sind (Shete *et al.* 2009; Wrensch *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010b). In *C. elegans* wurde für RTEL1 auch eine meiotische Funktion beschrieben (Youds *et al.* 2010). In Mutanten von RTEL1 ist die meiotische Crossover-Frequenz erhöht und die Crossover-Interferenz gestört. Daher wird postuliert, dass RTEL1 auch in der Meiose am SDSA-Weg der Auflösung von meiotischen Rekombinationsintermediaten ohne Crossover beteiligt ist. RTEL1 wurde im Menschen als Analogon der Antirekombinase Srs2 aus der Bäckerhefe beschrieben, für die in Säugetieren kein Homolog existiert (Barber *et al.* 2008). Srs2 reguliert HR, indem es D-Loops aufwindet und RAD51-Filamente von Einzelsträngen verdrängen kann (Liefshitz *et al.* 1998; Krejci *et al.* 2003; Macris und Sung 2005; Branzei und Foiani 2007; Dupaigne *et al.* 2008; Antony *et al.* 2009; Übersicht in Marini und Krejci 2010)

Für das Homolog SRS2 in *Arabidopsis thaliana* konnte *in vitro* eine antirekombinogene Funktion als Helikase, aber auch eine Aktivität zur Paarung von Einzelsträngen beschrieben werden (Blanck *et al.* 2009). Neben einem Srs2-Homolog konnte in *Arabidopsis* auch ein RTEL1-Homolog identifiziert werden (Knoll 2011; Knoll und Puchta 2011). Beide agieren in unabhängigen Wegen der Suppression der HR an stehengebliebenen Replikationsgabeln, aber nur RTEL1 ist an der Reparatur Cisplatin-induzierter Schäden epistatisch zur RecQ-Helikase RECQ4A beteiligt. Es wurden zudem für RTEL1 in *Arabidopsis* meiotische Funktionen beschrieben (Knoll 2011). Mutanten von RTEL1 zeigen eine eingeschränkte Fertilität. Über Chromatinpräparation konnten in der späten Prophase I Verknüpfungen zwischen Chromosomenenden visualisiert werden, dies deutet auf eine Beteiligung am meiotischen Telomerstoffwechsel hin. Außerdem wurden anstelle von 5 Bivalenten am Ende der Prophase I 10 Einheiten beobachtet, die zu je 10 kleineren Einheiten in der Anaphase I aufgeteilt wurden. Diese Beobachtung kann durch eine Paarung von einzelnen Chromatiden und einen Verlust der Schwesterchromatidkohäsion erklärt werden. Eine Rolle von RTEL1 in der Auflösung meiotischer Rekombinationsintermediate über den SDSA-Weg ähnlich zum Homolog in *C. elegans* konnte zwar nicht direkt nachgewiesen werden, aber die Beteiligung an der somatischen HR und ein meiotischer Einfluss lässt diese Rolle durchaus auch in *Arabidopsis* plausibel erscheinen.

1.4.6. Die Helikase / Translokase FANCM

Fanconi Anämie (FA) ist eine seltene Erbkrankheit, deren Symptome u.a. verminderte Fertilität, Entwicklungsdefekte, Störungen des blutbildenden Systems und eine starke Prädisposition für Krebserkrankungen darstellen (eine Übersicht findet sich in Moldovan und D'Andrea 2009; Kee und D'Andrea 2010; Deans und West 2011; Su und Huang 2011). Alle Symptome der FA werden letztlich durch chromosomale Instabilität verursacht. In Zellen von FA-Patienten akkumulieren DNA Schäden, erkennbar an dem stark erhöhten Auftreten von Chromosomenbrüchen und radialen Chromosomen. Das auffälligste zelluläre Kennzeichen von FA-Zellen ist die Hypersensitivität gegenüber crosslinkenden Genotoxinen wie Mitomycin C (MMC). Es wurden bisher 15 Gene identifiziert, die mit FA assoziiert sind (Su und Huang 2011), interessanterweise sind darunter auch viele Gene, die schon bereits im Zusammenhang mit erblich bedingtem Brustkrebs und der homologen Rekombination entdeckt wurden. So ist beispielsweise FANCD1 identisch mit BRCA2. Alle FA-Proteine kooperieren in der Reparatur von Intrastrangcrosslinks (ICLs) über den sogenannten FA-Weg der ICL-Reparatur. Dieser führt über eine HR-vermittelte Stabilisation der Replikationsgabel und schafft während der Replikation die Möglichkeit zur HR-vermittelten Reparatur von ICLs (Deans und West 2011). Das Protein FANCM interagiert hierbei mit der blockierten Replikationsgabel und dient der Rekrutierung weiterer FA-Proteine, welche letztlich die HR

aktivieren. Auch der RTR-Komplex interagiert mit FANCM. *In vitro* konnte für das menschliche FANCM keine Helikase-, aber eine Translokaseaktivität nachgewiesen werden.

Für das FANCM-Homolog in der Bäckerhefe Mph1 konnte jedoch eine echte DNA-Helikaseaktivität und das Entwinden von D-Loops *in vitro* gezeigt werden (Prakash *et al.* 2005; Gari *et al.* 2008a; Gari *et al.* 2008b; Prakash *et al.* 2009). Mutanten von ScMph1 zeigen einen Hyperrekombinationsphänotyp und ScMph1 ist auch an der Reparatur von Schäden an der Replikationsgabel beteiligt (Schürer *et al.* 2004; Panico *et al.* 2010). Neueste Untersuchungen von ScMph1 postulieren allerdings, das ScMph1 wichtig für die RAD51-vermittelte Stranginvasion in Schwesterchromatiden ist und den sich ausbildenden D-Loop stabilisiert, aber durch seine D-Loop-dissoziierende Aktivität die Ausbildung doppelter Holliday-Junctions unterdrückt und dadurch der Bildung von Crossovern entgegenwirkt (Panico *et al.* 2010; Ede *et al.* 2011). Mutanten von ScMph1 zeigen zwar einen leichten Sporulationsdefekt, eine wichtige Rolle in der Meiose wird aber nicht postuliert (Scheller *et al.* 2000).

Auch in *Arabidopsis thaliana* konnte ein Homolog zu FANCM identifiziert werden (Knoll 2011; Knoll und Puchta 2011). Untersuchungen der somatischen HR-Ereignisse in *Atfancm*-Mutanten zeigten, dass auch in *Arabidopsis* FANCM an der Homologie-vermittelten Reparatur an der Replikationsgabel beteiligt ist. Außerdem wurde eine Aufgabe von FANCM im SDSA-Weg der Reparatur von Doppelstrangbrüchen postuliert. *Atfancm*-Mutanten zeigten neben somatischen HR-Phänotypen auch eine eingeschränkte Fertilität. In Chromatinpräparation von Pollenmutterzellen von *Atfancm-1* wurden verschiedene Meiosedefekte gefunden, die auf eine Beteiligung von FANCM in *Arabidopsis* in der meiotischen Rekombination schließen lassen (Knoll 2011).

1.4.7. SPG48 – eine putative Helikase der DNA-Reparaturmaschinerie

In einem genomweiten esiRNA-Screen in HeLa-Zellen zur Identifizierung von Genen, deren Produkte in die DNA-Doppelstrangbruchreparatur involviert sind, bestimmten Slabicki *et al.* (2010) insgesamt 61 Gene, bei denen der Knockdown die Frequenz homologer Rekombination beeinflusste. Im Detail analysierten sie das zuvor noch nicht beschriebene Gen *SPG48*, dessen Knockdown zu einer stark verringerten Rate homologer Rekombination und zu einer Hypersensitivität gegenüber dem Crosslinker Mitomycin C führte. Durch bioinformatische Analyse konnte eine strukurbasierte Homologie zu Helikasen der Superfamilie 2 nachgewiesen werden und die Helikasemotive I, Ia, II, III, IV und V identifiziert werden. Expression von getaggetem SPG48-Protein in HeLa-Zellen und Immunoblotting ergab Hinweise auf die Existenz von zwei Isoformen des Proteins – einer kürzeren, die vor allem in

nukleären Extrakten vorherrscht und einer längeren, die vor allem im zytoplasmatischen Extrakt nachgewiesen werden konnte.

Durch Co-Immunoprecipitation konnte die Interaktion von SPG48 mit den Proteinen SPG11 und SPG15 aufgezeigt werden. Beide Proteine sind mit der Erbkrankheit erbliche spastische Spinalparalyse (HSP) assoziiert (Stevanin *et al.* 2007; Hanein *et al.* 2008; Schüle *et al.* 2009). Diese ist eine neurodegenerative Erkrankung, für die, ausgehend vom oberen Motoneuron, eine zunehmende Spastik und Lähmung in den Beinen charakteristisch ist (Espinosa und Palau 2009). HSP ist eine klinisch und genetisch sehr heterogene Erkrankung, die bisher mit 48 Loci assoziiert werden konnte. Das Vorkommen der Krankheit wird auf 3 bis 10 Fälle pro 100.000 in Europa geschätzt (Salinas *et al.* 2008). Das Erkrankungsalter kann in der frühen Kindheit bis zum Alter von 70 Jahren liegen. Klinisch wird zwischen der reinen HSP und der komplizierten HSP unterschieden, die neben spastischer Lähmung der Beine auch andere neurologische Defekte einschließt. Reine HSP wird in 70 % der Fälle autosomal dominant vererbt, kann aber auch rezessiv und X-assoziiert rezessiv vererbt werden. Viele der assoziierten Proteine sind in Transmembrantransfer und axonale Transportprozesse involviert. Auch die Mutation in SPG48 konnten in HSP-Patienten nachgewiesen werden und Zelllinien, die aus Zellen dieser Patienten etabliert wurden, waren hypersensitiv gegenüber dem Crosslinker Mitomycin C und dem DSB-induzierenden Agens Bleomycin (Slabicki *et al.* 2010). Damit wurde eine putative Helikase identifiziert, die eine Verbindung der HSP mit der DNA-Reparatur über homologe Rekombination erkennen lässt.

1.5. Die Tomate *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom als neuer Modellorganismus für die Erforschung meiotischer Rekombination

Die Tomate *Solanum lycopersicum* ist eine Pflanze aus der Familie der Nachtschattengewächse, zu der außerdem der Tabak, die Kartoffel, die Paprika und die Aubergine gehören (Wu und Tanksley 2010). Sie wird weltweit angebaut und hat als wichtiger Bestandteil der Ernährung vieler Menschen eine hohe wirtschaftliche Bedeutung. Die Weltjahresproduktion 2009 lag bei ca. 150 Millionen Tonnen, mit einer Produktion von 23 Millionen Tonnen auf einer Erntefläche von ca. 310.000 ha in Europa (Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org>, letzter Zugriff am 07.10.2011). Die Tomate bietet als Modellpflanze viele Charakteristika, die in *Arabidopsis* nicht erforscht werden können, so z. B. die Entwicklung klimakterischer fleischiger Beerenfrüchte und das von der Photoperiode unabhängige sympodiale Blühen (Carvalho *et al.* 2011). Die Tomate hat eine haploide Chromosomenzahl von 12 in einem Genom von 950

Megabasenpaaren Größe, das ca. 35 000 Gene codieren soll. Interessanterweise gibt es für ca. 30 % der Gene keine Entsprechung in Arabidopsis. Die Mehrzahl der Gene sind in kontinuierlichen Abschnitten angeordnet und nur ca. 25 % des Genoms ist Euchromatin, die restlichen 75 % sind zentromerische Heterochromatinregionen (Peterson *et al.* 1998; Van der Hoeven *et al.* 2002). Das Genom der Tomate wird durch ein Internationales Konsortium als Teil der Initiative „International Solanaceae Genome Project (SOL)“ sequenziert und annotiert (Mueller *et al.* 2005a; Mueller *et al.* 2005b; Mueller *et al.* 2009; Bombarely *et al.* 2011) und eine Vorversion des Referenzgenoms *Solanum lycopersicum* cv. Heinz 1706 ist über die Datenbank SOL Genomics Network (<http://solgenomics.net>, letzter Zugriff am 14.10.2011) verfügbar.

Das Kultivar (cv.) Micro-Tom ist eine Zwergvariante der Tomate, die ursprünglich als Pflanze für den Hobbygartenbau gezüchtet wurde (Scott und Harbaugh 1989), die in den letzten Jahren aber immer mehr Bedeutung als Modellorganismus gewonnen hat (Campos *et al.* 2010). Micro-Tom wird nur 10 bis 20 cm groß, kann in einer Dichte von bis zu ca. 1350 Pflanzen pro m² angezogen werden und hat eine Lebenszyklusdauer von nur 70 bis 90 Tagen (Meissner *et al.* 1997). Abbildung 5 zeigt Micro-Toms in verschiedenen Entwicklungszuständen. Zudem ist Micro-Tom über Agrobakterien transformierbar, es wurden Protokolle zur stabilen und transienten Transformation etabliert (Meissner *et al.* 1997; Dan *et al.* 2006; Orzaez *et al.* 2006; Sun *et al.* 2006). Das Kultivar Micro-Tom trägt drei Mutationen, die verantwortlich für den Zwergwuchs sein sollen: *dwarf* (*d*), *self-prunning* (*sp*) und *miniature* (*mnt*). Das Protein D ist eine Oxidase in der Brassinosteroid-Synthese. SP ist ein Regulatorprotein, welches die Alternierung vegetativer und reproduktiver Stängel zum sympodialen Wuchs koordiniert. Für das Allel MNT wurde postuliert, dass es mit dem Gibberellin-Signalweg assoziiert ist, allerdings wurde keine genauere Charakterisierung vorgenommen (Marti *et al.* 2006). Es wurden verschiedene Mutagenesen im Micro-Tom-Hintergrund durchgeführt, die auch teilweise in Kollektionen zusammengefasst für die wissenschaftliche Öffentlichkeit zugänglich sind (Emmanuel und Levy 2002; Matsukura *et al.* 2008; Saito *et al.* 2011).

Durch die vergleichsweise großen Knospen und auch Meiosestadien und die relativ übersichtliche Anzahl an Chromosomen ist die Tomate auch für die Meiosezytologie ein vorteilhafter Organismus. Es wurden in verschiedenen elektronenmikroskopischen und lichtmikroskopischen Studien an synapsierten Pachytänchromosomen die Orte der Crossover-Bildung als Late Recombination Nodules visualisiert und detaillierte Rekombinationskarten erstellt (Sherman und Stack 1995; Anderson und Stack 2005). Außerdem wurde in den letzten Jahren damit begonnen, meiotische Proteine zu immunolokalisieren (Lhuissier *et al.* 2007; Lohmiller *et al.* 2008; Qiao *et al.* 2011).

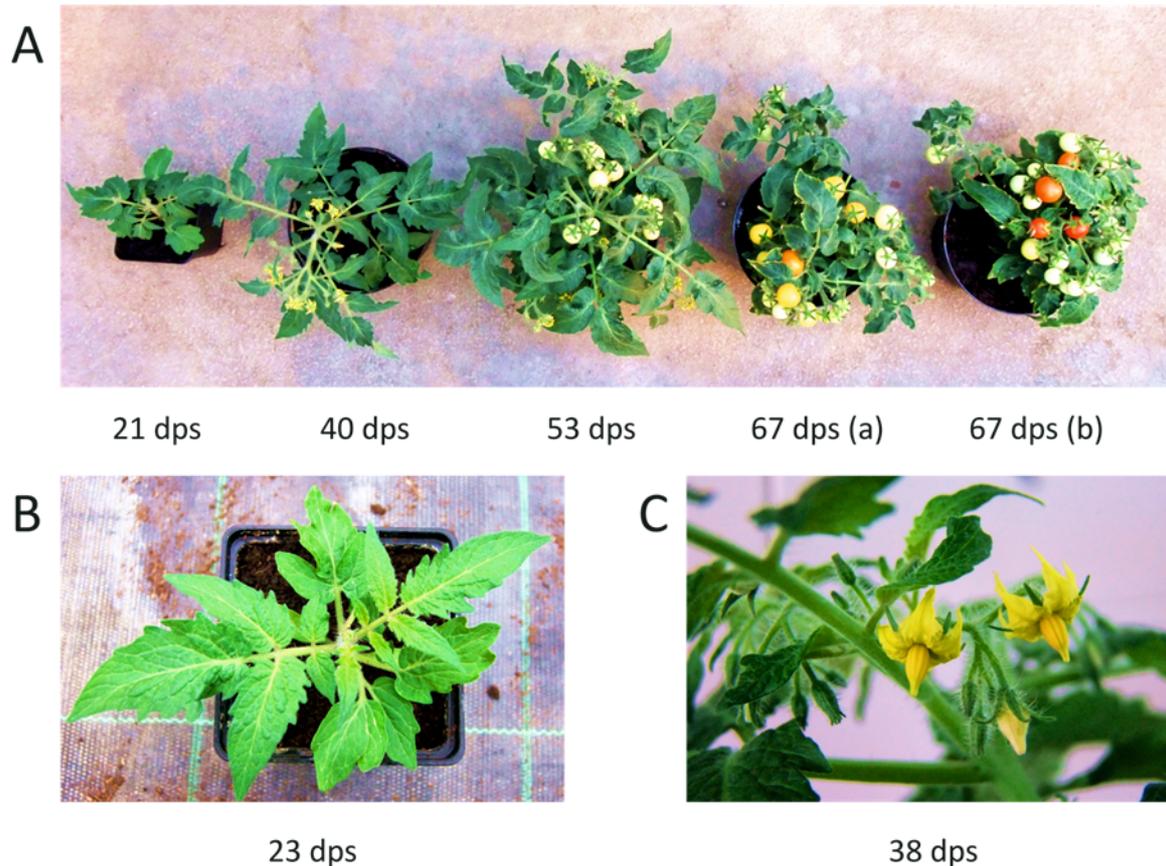


Abbildung 5: Micro-Tom in verschiedenen Entwicklungszuständen. (A) Aufsicht auf verschieden alte Micro-Tom-Pflanzen. Von links nach rechts bilden sich die ersten Knospen, die Micro-Tom fängt an zu blühen, die ersten grünen Früchte werden angesetzt und reifen schließlich nach und nach. Die ersten reifen Tomaten können ca. 63- 70 Tage nach Aussaat geerntet werden (dps = Tage nach Aussaat). (B) Micro-Tom bei der ersten Knospenbildung. (C) Blüten und Knospen von Micro-Tom in Nahaufnahme.

Die Kombination aus den günstigen Anzuchtsbedingungen, der Möglichkeit der genetischen Manipulation, der guten zytologische Zugänglichkeit, sowie der Verfügbarkeit von Gensequenzen und Mutanten macht das Kultivar Micro-Tom zukünftig zu einem sehr potenten Modellorganismus für alle Belange pflanzlicher Forschung, insbesondere der Erforschung und Manipulation meiotischer Rekombination.

1.6. Ziele der Arbeit

Die Prozesse der somatischen und meiotischen Rekombination sind in allen Organismen komplex reguliert, um die Stabilität des Genoms zu erhalten, aber auch die genetische Vielfalt fördern zu können. Pflanzen sind zu Untersuchung dieser Mechanismen besonders gut geeignet, da Mutationen in Schlüsselproteinen der Rekombinationsprozesse im

Gegensatz zum tierischen System zumeist nicht zur Letalität führen. Daher können über verschiedene *in vitro* und *in vivo*-Untersuchungssysteme die Funktionen einzelner Proteine und deren Zusammenarbeit in den Stoffwechselwegen aufgeklärt werden.

2010 wurde das Protein SPG48 als wichtiger Faktor der somatischen homologen Rekombination im Menschen identifiziert. Außerdem wurde der Ausfall von SPG48 mit einer erblichen neurodegenerativen Erkrankung in Verbindung gebracht. Daher sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob auch im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ein Homolog zum menschlichen SPG48 identifiziert werden kann. Weiterhin sollte mithilfe von T-DNA-Insertionsmutanten eine Beteiligung des SPG48-Proteins in der somatischen DNA-Reparatur und in der meiotischen Rekombination in *Arabidopsis thaliana* untersucht werden.

Zur spezifischen Adressierung von Proteinen ohne deren Markierung mit z.B. einem Affinitätstag, werden Antikörper benötigt, die gegen diese Proteine entwickelt wurden. Mithilfe von Antikörper kann dann eine Charakterisierung eines Proteins über zytologische und biochemische Methoden erfolgen. In dieser Arbeit sollten Antikörper gegen die Proteine AtFANCM und AtRTEL1 gewonnen werden, um diese in nachfolgenden Arbeiten zur weiteren Charakterisierung der beiden Proteine verwenden zu können. Dazu sollten geeignete Epitope bestimmt und die Immunisierung einer gewählten Tierspezies in Auftrag gegeben werden. Außerdem sollten die erhaltenen Antikörper über die Methode des Western Blot in Bezug auf die Erkennung der verwendeten Epitope validiert werden.

Die Immunlokalisation ist eine potente Methode zur Charakterisierung der lokalen und temporalen Verteilung von Proteinen während der Vorgänge von Meiose. Zur Etablierung dieser Methode am Lehrstuhl Botanik II sollten verschiedene Proteine zunächst im Wildtyp lokalisiert werden. Dazu sollten die verwendeten Protokolle so angepasst werden, dass auch Antikörper aus derselben Spezies in einer dualen Lokalisation verwendet werden können.

Über die Immunlokalisation von Schlüsselproteinen der meiotischen Rekombination in Mutanten, kann eine kausale Beziehung zwischen dem lokalisierten Protein und dem in der Mutante ausgeschalteten Protein hergestellt werden. Daher sollten Mutanten von Proteinen der meiotischen Rekombination, die am Lehrstuhl charakterisiert wurden, weitergehend beschrieben werden. Im Besonderen sollte untersucht werden, ob BRCA2 in *Arabidopsis* auch als Mediator der RAD51- und DMC1-vermittelten homologen Rekombination dient.

Die Zwergvariante der Tomate *Solanum lycopersicum*, die sogenannte Micro-Tom, hat viele Vorteile, die sie als neuen Modellorganismus für die Untersuchung somatischer und meiotischer Rekombination in Pflanzen prädestinieren. So ist sie zytologisch gut zugänglich und in jüngster Zeit wurden Mutantendatenbanken etabliert, die unter anderem auch meiotische Mutanten für die wissenschaftliche Öffentlichkeit verfügbar machen. Daher sollte die grundlegende zytologische Charakterisierung von Micro-Tom Pollenmutterzellen über die Chromatinpräparation am Lehrstuhl etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Standardchemikalien und Geräte

Alle Standardchemikalien wurden als Feinchemikalien von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG, Sigma-Aldrich Co- LLC, Merck KGaA, Serva Elektrophoresis GmbH oder AppliChem GmbH bezogen. Im Folgenden werden daher alle Standardchemikalien ohne Herstellerangaben aufgeführt. Bei Spezialchemikalien wird jedoch der Hersteller genannt, da ein Einfluss der Herkunft der Chemikalie nicht ausgeschlossen werden kann. Weitere Gebrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Sarstedt AG & Co, Carl Roth GmbH + Co. KG oder VWR international GmbH bezogen. Auch bei verwendeten Geräten wird auf die genauere Nennung des Herstellers und der Bauart verzichtet sofern dies keinen Einfluss auf den Ausgang des Experiments vermuten lässt.

2.2. Pflanzenarbeiten

2.2.1. Mutantenlinien von *Arabidopsis thaliana*

Die verwendeten Mutantenlinien wurde aus den Kollektionen SALK (Alonso *et al.* 2003), SAIL (McElver *et al.* 2001) und GABI (Rosso *et al.* 2003) bezogen. Tabelle 1 zeigt alle verwendeten Linien. Als Wildtyp wurde jeweils der Ökotyp Columbia verwendet.

Als Reporterlinie für die Quantifizierung der homologen Rekombination (siehe Kapitel 2.2.10) wurde IC9C (Molinier *et al.* 2004) verwendet.

Tabelle 1: Mutantenlinien aus *Arabidopsis thaliana*. Dargestellt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mutantenlinien mit den wichtigsten Informationen zu Genlokus, Bezeichnung und Charakterisierung.

Gen	Genlokus	Linienbezeichnung	Mutantenbezeichnung	Charakterisierung
BRCA2	<i>BRCA2A</i> : At4g00020 <i>BRCA2B</i> : At5g01630	GK_290C04 SALK_037617	<i>brca2</i> (Doppelmutante)	Seeliger <i>et al.</i> 2011
RAD51	At5g20850	GK_134A01	<i>rad51-1</i>	Li <i>et al.</i> 2004
DMC1	At3g22880	SAIL_170_F08	<i>dmc1-1</i>	Couteau <i>et al.</i> 1999
MSH4	At4g17380	SALK_136296	<i>msh4-1</i>	Higgins <i>et al.</i> 2004
TOP3α	At5g63920	GK_476A12	<i>top3α-2</i>	Hartung <i>et al.</i> 2008
RMI1	At5g63540	SALK_93589	<i>rmi1-1</i>	Hartung <i>et al.</i> 2008
RTEL1	At1g79950	SALK_113285	<i>rtel1-1</i>	Knoll 2011
FANCM	At1g35530	SALK_069784	<i>fancm-1</i>	Knoll 2011
SPG48	At3g15160	SALK_021747C	<i>spg48-1</i>	vorliegende Arbeit

2.2.2. Oberflächensterilisation von *Arabidopsis thaliana* Saatgut

Hypochloritlösung	12 %	NaClO ddH ₂ O
Agaroselösung	0,1 %	Agarose SeaKem LE (Lonza) ddH ₂ O

Zur Oberflächensterilisation wurde eine entsprechende Menge Saatgut in ein Mikrozentrifugiergefäß abgefüllt und 500 μ l ddH₂O zugegeben. Anschließend wurde ein Tropfen Tween 20 und 500 μ l Hypochloritlösung hinzupipettiert und für 6 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei ca. 600 g für 3 min wurde der Überstand unter sterilen Bedingungen abgenommen. Zur Entfernung des Hypochlorits wurde 1 ml steriles ddH₂O zugegeben, durch Invertieren gemischt und für 30 s bei ca. 600 g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal ausgeführt. Abschließend wurde 1 ml Agaroselösung zugegeben. Das Saatgut wurde bei 4 °C gelagert. Die Aussaat erfolgte nach einer Stratifikationszeit von mindestens 12 Stunden.

2.2.3. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

GM-Festmedium	4,9 g/L	Murashige&Skoog-Medium (Duchefa)
	10 g/L	Saccharose
	7,6 g/L	Plant Agar (Duchefa)
		ddH ₂ O

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 5,7 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde das Medium unter sterilen Bedingungen in Plastik-Petrischalen gegossen.

Zur Anzucht unter axenischen Bedingungen wurde oberflächensterilisiertes Saatgut von *Arabidopsis thaliana* auf GM-Festmedium ausgesät. Dazu wurden jeweils mehr als 100 Samen einzeln auf jede Platte pipettiert. Die Anzucht erfolgte in einem Anzuchtschrank CU-36L4 (Percival Scientific) unter Langtagbedingungen – 16 h Tag bei 22°C Umgebungstemperatur und 8 h Nacht bei 20 °C Umgebungstemperatur.

Zur Aussaat auf Erde wurde *Arabidopsis thaliana* Saatgut über Nacht in Leitungswasser stratifiziert und anschließend in 5cm-Vierkanttöpfen mit jeweils zwei bis drei Samen pro Topf in einer Mischung aus einem Teil Floraton 3 (Floragard) und einem Teil Vermiculit (Deutsche Vermiculite, Dämmstoff GmbH) ausgebracht. Die Pflanzen wuchsen unter Langtagbedingungen im Gewächshaus mit zusätzlicher künstlicher Beleuchtung – 16 h Tag und 8 h Nacht bei jeweils ca. 22 °C Umgebungstemperatur. Sollten die Pflanzen einer Genotypisierung unterzogen werden, wurden sie nach ca. zwei bis drei Wochen Wachstumszeit vereinzelt. Die Generationszeit von *Arabidopsis thaliana* unter diesen Anzuchtbedingungen belief sich auf ca. sechs bis acht Wochen. Das Saatgut wurde aus den reifen Schoten geerntet und kühl und trocken gelagert.

2.2.4. Anzucht von *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

Das Saatgut von *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom wurde von Avraham Levy (Weizmann Institute of Science; Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt (Meissner *et al.* 1997). Zur Aussaat auf Erde wurden 10 Samen von Mico-Tom auf Erde in einen 8cm-Vierkanttopf ausgebracht. Die Pflanzen wuchsen unter Langtagbedingungen im Gewächshaus – 16 h Tag und 8 h Nacht bei jeweils ca. 22 °C. Nach einer Woche wurden die Pflanzen in einzelne 8cm-Vierkanttöpfe pikiert und drei Wochen nach Aussaat in 15cm-Rundtöpfe umgesetzt. Unter diesen Anzuchtbedingungen konnten nach 10 Wochen die ersten reifen Früchte geerntet werden. Zur Gewinnung von Saatgut wurden die Tomaten mit einem Messer aufgeschnitten und das Mark mit den Samen entfernt. Dieses wurde auf einem Filterpapier ausgestrichen und dann bei 37 °C getrocknet. Nach der Trocknung konnten die Samen vom Filterpapier

abgenommen werden. Das Saatgut wurde bis zur weiteren Verwendung kühl und trocken gelagert.

2.2.5. Kreuzen von *Arabidopsis thaliana*

Zur Einbringung des Konstruktes zur Quantifizierung homologer Rekombination (siehe Kapitel 2.2.10) wurden *Arabidopsis thaliana* Mutantenlinien mit Konstruktlinien gekreuzt. Dazu wurden die jeweiligen Linien auf Erde angezogen. Bei Pflanzen, die als Mutterpflanzen zur Kreuzung eingesetzt wurden, wurden sämtliche Schoten und offenen Blüten entfernt. Pro Blütenstand wurden jeweils bis zu drei Knospen mithilfe von Uhrmacherpinzetten geöffnet und der Fruchtknoten freipräpariert. Kelch-, Blüten- und Staubblätter der zu bestäubenden Knospen wurden dabei entfernt. Zur Bestäubung wurden offene Blüten der Vaterpflanzen abgetrennt und Pollen durch Vorbeiführen der geöffneten Blüten auf den Fruchtknoten der Mutterpflanzen überführt. Reife Schoten, die aus Kreuzung entstanden sind, wurden einzeln in Mikrozentrifugiergefäße geerntet und die Samen herausgelöst. Das aus der Kreuzung entstandene Saatgut wurde wiederum auf Erde ausgebracht und die Pflanzen genotypisiert. Zur Untersuchung der Frequenz der homologen Rekombination wurden aus der nachfolgenden Generation jeweils Pflanzen ausgewählt die das Assaykonstrukt und die T-DNA-Insertion homozygot tragen. Als Wildtypkontrolle wurden Pflanzen der nachfolgenden Generation ausgewählt, die das Assaykonstrukt homozygot, jedoch aber keine T-DNA-Insertion tragen.

2.2.6. Fertilitätsanalyse von *Arabidopsis thaliana*

Entfärbelösung	80 %	Ethanol (vergällt) ddH ₂ O
----------------	------	--

Zur Untersuchung der Fertilität von Mutantenlinien wurden die jeweilige Linie und der Wildtyp auf Erde ausgebracht und unter gleichen Bedingungen im Gewächshaus angezogen. Es wurden mindestens 5 Pflanzen je Linie zur Untersuchung herangezogen und von jeder Pflanze je mindestens 5 reife Schoten verwendet. Die Schoten wurden in Entfärbelösung überführt und mehrere Tage bei Raumtemperatur entfärbt. Dann wurde die Samenanzahl pro Schote unter dem Binokular bestimmt. Der Vergleich zwischen der durchschnittlichen Samenanzahl der Wildtypschoten mit der der Mutantenlinienschoten ließ eine Aussage über die Fertilität der Mutantenlinie zu.

2.2.7. Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* zur Genotypisierung

Isolationspuffer	0,2 M	Tris-HCl (pH 9,0)
	0,4 M	LiCl
	0,25 M	EDTA
	1 %	SDS
		ddH ₂ O
TE-Puffer	0,01 M	Tris-HCl (pH 8,0)
	1 mM	EDTA
		ddH ₂ O

Zur Extraktion genomischer DNA wurde ein Blattstück der jeweiligen Pflanze mit einer Pinzette abgenommen und gegebenenfalls zur Lagerung bei -20 °C aufbewahrt. Das Blattstück wurde im Mikrozentrifugiergefäß gemörsert und die Suspension wurde mit 500 µl Isolationspuffer versetzt. Anschließend wurde nochmals gemörsert. Das Abtrennen von Pflanzenmaterialresten erfolgte durch Zentrifugation bei ca. 13.700 g für 5 min. Zu 400 µl Isopropanol in einem weiteren Mikrozentrifugiergefäß wurden 400 µl des Überstandes aus der Zentrifugation pipettiert und durch Invertieren gemischt. Die gefällte genomische DNA wurde durch Zentrifugation bei ca. 18.600 g für 10 min abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für mindestens 15 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde abschließend in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und durch Schütteln gelöst. Zur Genotypisierung wurden jeweils 3 µl der DNA-Lösung in einer Polymerasekettenreaktion verwendet.

2.2.8. Extraktion von RNA aus *Arabidopsis thaliana* zur Expressionsanalyse

Die Anzucht von Pflanzenmaterial für die RNA-Extraktion erfolgte unter axenischen Bedingungen auf GM-Festmedium für zwei bis drei Wochen im Anzuchtschrank CU-36L4 (Percival Scientific). Es wurden jeweils 100 mg Pflanzenmaterial in ein Mikrozentrifugiergefäß geerntet und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Extraktion von RNA erfolgte mithilfe des innuPrep Plant RNA Kits (Analytik Jena) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zusätzlich wurde vor dem Waschschrift der gebundenen RNA auf der Säule ein DNAase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden pro Ansatz 10 µl DNAase I (Qiagen) mit 70 µl RDD-Puffer (Qiagen) vermischt und auf die Säule pipettiert. Diese wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann wie vom Hersteller beschrieben mit dem Waschen der RNA fortgefahren.

Der Erfolg der Extraktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend der Gehalt an RNA mithilfe des Qubit® RNA BR Assay Kits am Qubit®-Fluorometer (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben bestimmt.

2.2.9. Assay zur Untersuchung von *Arabidopsis thaliana* auf Hypersensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien

GM-Flüssigmedium 4,9 g/L Murashige & Skoog-Medium (Duchefa)
 10 g/L Saccharose
 ddH₂O

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 5,7 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert.

Die Anzucht von Pflänzchen für den Sensitivitätsassay wurde unter axenischen Bedingungen auf GM-Festmedium durchgeführt. Nach der Oberflächensterilisation wurde das Saatgut am nächsten Tag einzeln ausgebracht und im Anzuchtschrank CU-36L4 (Percival Scientific) angezogen. Am siebten Tag nach der Aussaat wurden die Pflänzchen mithilfe einer Pinzette unter sterilen Bedingungen auf GM-Flüssigmedium umgesetzt. Dabei wurde je 4 ml GM-Flüssigmedium in eine Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben und pro Vertiefung wurden je 10 Pflänzchen einer Linie eingesetzt. Die 6-well-Platten wurden weiterhin im Anzuchtschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die genotoxischen Agenzien in 1 ml GM-Flüssigmedium auf die einzusetzende Konzentration verdünnt und zur jeweiligen Vertiefung gegeben. Ein Überblick über die eingesetzten genotoxischen Agenzien und Konzentrationen ist in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2: Genotoxine für Sensitivitätsassays. Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die verwendeten Genotoxine, sowie die Konzentrationen der Stammlösungen und der verwendeten Inkubationslösungen.

Genotoxin	Stammlösung	verwendete Konzentrationen
Bleomycinsulfat (Duchefa)	1 mg/ml	2 µg/ml; 5 µg/ml
Mitomycin C (Duchefa)	1 mg/ml	10 µg/ml; 20 µg/ml
Cisplatin (Sigma-Aldrich)	1 mM	5 µM; 10 µM
Methylmethansulfonat (Sigma-Aldrich)	100 %	75 ppm; 100 ppm
Hydroxyurea (Sigma-Aldrich)	20 mM	2 mM; 4 mM
Camptothecin (Sigma-Aldrich)	10 nM	150 nM; 300 nM

Am 21. Tag nach Aussaat wurde das Frischgewicht pro 10 eingesetzten Pflänzchen bestimmt. Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden die Pflänzchen bei 60 °C über Nacht getrocknet und erneut gewogen. Die Auswertung erfolgte jeweils als Gewichtsprozent

bezogen auf das Gewicht der jeweiligen Linie ohne Mutagenzugabe. Eine Aussage über Hypersensitivität konnte so im Vergleich der relativen Gewichte von Mutantenlinien gegenüber einer Wildtypkontrolle getroffen werden.

2.2.10. Assay zur Quantifizierung der Raten homologer Rekombination in *Arabidopsis thaliana*

Phosphatpuffer	0,1 M	NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0) ddH ₂ O
Natriumazidlösung	1 %	NaN ₃ ddH ₂ O
X-Glc-A-Lösung	2,5 %	X-Glc-A (Duchefa) DMSO
Färbelösung	37,2 ml 0,8 ml 2 ml	Phosphatpuffer Natriumazidlösung X-Glc-A-Lösung
Entfärbelösung	80 %	Ethanol (vergällt) ddH ₂ O

Mithilfe des Reporterkonstruktes IC9C (Molinier *et al.* 2004) können die Raten homologer Rekombination quantifiziert werden. Im IC9C-Konstrukt sind ein N-terminales und ein C-terminales Fragment des β -Glucuronidase-Gens, die beide den zentralen Teil des Gens enthalten, nacheinander angeordnet. So kann durch homologe Rekombination eine Restauration des Gens bewirkt werden, welche zu einer Expression der β -Glucuronidase führt. Ein Ereignis homologer Rekombination kann somit über eine chromogene Reaktion als blauer Sektor auf den Pflänzchen sichtbar gemacht und quantifiziert werden. Im Konstrukt IC9C liegen die beiden Fragmente in direkter Orientierung zueinander, so dass eine Restauration des β -Glucuronidase-Gens nur über intermolekulare homologe Rekombination erreicht werden kann. Für den Rekombinationsassay wurden Linien verwendet, die aus einer Kreuzung der Mutantenlinie mit der Reporterkonstruktlinie erhalten wurden und die jeweils das Reporterkonstrukt homozygot und eine homozygote bzw. keine T-DNA-Insertion im jeweiligen Genlocus tragen.

Die Anzucht von Pflänzchen für den Rekombinationsassay erfolgte analog zur Anzucht von Pflänzchen für den Sensitivitätsassay (siehe Kapitel 2.2.9). Am siebten Tag nach der Aussaat wurden jeweils 50 Pflänzchen pro Linie mithilfe einer Pinzette unter sterilen Bedingungen in eine Halbschale mit 9 ml GM-Flüssigmedium umgesetzt. Sollten Doppelstrangbrüche mithilfe von Bleomycin induziert werden, so wurde die entsprechende Menge Bleomycin in 1 ml GM-

Flüssigmedium verdünnt und in die Halbschale zugegeben. Die Endkonzentration des Bleomycin zur Induktion von Doppelstrangbrüchen betrug 5 µg/ml. Für Proben ohne zusätzliche Induktion von Doppelstrangbrüchen wurde 1 ml GM-Flüssigmedium in die Halbschale zugegeben. Am 14. Tag nach der Aussaat wurden die Pflänzchen in ca. 7ml Färbelösung überführt und zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Zum Entfärben der Pflänzchen wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt und für mindestens 3 h bei 60 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der blauen Punkte auf den Blättchen unter dem Binokular. Eine Aussage über eine veränderte Rate der homologen Rekombination konnte durch den Vergleich der Rate der Mutantenlinien gegenüber der des ausgekreuzten Wildtyps getroffen werden.

2.3. Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1. Polymerasekettenreaktion

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmente wurden Polymerasekettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Dies diente der Genotypisierung von Mutanten, der Herstellung bestimmter DNA-Fragmente zur Klonierung bzw. Sequenzierung, der Analyse von Klonierungsprodukten und der Qualitätsüberprüfung gewonnener cDNA. Es kamen verschiedene Polymerasen zum Einsatz: Neben Taq-Polymerase, die von Mitarbeitern des Lehrstuhls Botanik II hergestellt wird, wurde für die Genotypisierung auch Dream-Taq (Fermentas GmbH) eingesetzt. Zur Herstellung von Klonierungsfragmenten bzw. Fragmenten zur Sequenzierung wurde die Phusion-Polymerase (Finnzymes) eingesetzt. Abbildung 6 zeigt exemplarisch je einen PCR-Ansatz und ein PCR-Protokoll für die Verwendung jeder der genannten Polymerasen. Für die Polymerasen wurde jeweils der zugehörige Puffer eingesetzt. Die Amplifikationszeit wurde je nach Länge des zu vervielfältigenden Fragments und der Amplifikationsgeschwindigkeit der verwendeten Polymerase angepasst. Die Annealingtemperatur der Primer wurde mit dem Programm Oligo Analyzer (Version 1.0.3) bestimmt. Eine Aufstellung aller verwendeten Primer und deren Kombinationen für entsprechende PCRs findet sich im Anhang der vorliegenden Arbeit (Tabellen 6-8 und 12).

A	B	C
Template x µl	Template x µl	Template x µl
Primer 1 (50 µM) 0,5 µl	Primer 1 (50 µM) 0,5 µl	Primer 1 (50 µM) 0,5 µl
Primer 2 (50 µM) 0,5 µl	Primer 2 (50 µM) 0,5 µl	Primer 2 (50 µM) 0,5 µl
dNTPs (10 mM) 1,0 µl	dNTPs (10 mM) 1,0 µl	dNTPs (10 mM) 1,0 µl
Puffer (10x) 5,0 µl	Puffer (10x) 5,0 µl	Puffer (5x) 10,0 µl
eigene Taq 0,1 µl	Dream Taq 0,2 µl	Phusion 0,2 µl
ddH ₂ O auf 50,0 µl	ddH ₂ O auf 50,0 µl	ddH ₂ O auf 50,0 µl

Initiale Denaturierung 1 x	Initiale Denaturierung 1 x	Initiale Denaturierung 1 x
95 °C 3 min	95 °C 3 min	98 °C 2 min
Amplifikationszyklus: 35 x	Amplifikationszyklus: 35 x	Amplifikationszyklus: 35 x
95 °C 30 s	95 °C 30 s	98 °C 10 s
T _{Annealing} 30 s	T _{Annealing} 30 s	T _{Annealing} 30 s
72 °C 60 s / kb	72 °C 60 s / kb	72 °C 30 s / kb
Abschlusspolymerisation 1x	Abschlusspolymerisation 1x	Abschlusspolymerisation 1x
72 °C	72 °C	72 °C 5 min
Reaktionsstopp: 1x	Reaktionsstopp: 1x	Reaktionsstopp: 1x
12 °C	12 °C	12 °C

Abbildung 6: PCR-Ansätze und -Protokolle für alle verwendeten Polymerasen. Die Abbildung zeigt jeweils exemplarisch einen PCR-Ansatz und ein PCR-Protokoll für die (A) am Lehrstuhl hergestellte Taq-Polymerase, (B) die Dream Taq und (C) die Phusion Polymerase. Als Template wurden jeweils 3 µl genomische DNA, 1 µl cDNA bzw. aufgereinigte DNA oder 1 Kolonie *E. coli* aus einer Transformation eingesetzt.

2.3.2. Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)	2 M Tris
	1 M HAc
	50 mM EDTA
	ddH ₂ O

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 8,0 eingestellt.

SB-Puffer (20x)	0,2 M NaOH
	ddH ₂ O

Der pH-Wert wurde mit Borsäure auf 8,0 eingestellt.

Agarosegel	0,9 % Agarose SeaKem LE (Lonza)
	1x Puffer

Nach dem Aufkochen wurden 0,375µg/ml Ethidiumbromid zugegeben.

Ladepuffer (6x)	60 mM EDTA
	10 % Glycerin
	0,2 % Orange G
	0,05 % Xylencyanol FF

Zur Untersuchung von PCR-Fragmenten und Plasmiden wurde Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Es kamen 0,9 % SB-Ethidiumbromid-Agarosegele und 0,9 % TAE-Ethidiumbromid-Agarosegele zum Einsatz. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge Ladepuffer versetzt und geladen. Die Elektrophorese wurde bei der Verwendung von TAE-Gelen bei konstant 80 mA und bei Verwendung von SB-Gelen bei konstant 200 V durchgeführt und unter UV-Strahlung ausgewertet. Als Größenvergleich diente der GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas GmbH).

2.3.3. cDNA-Synthese

Aus extrahierter mRNA (siehe Kapitel 2.2.8) wurde mithilfe des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas GmbH) gemäß Herstellervorschrift cDNA synthetisiert. Hierfür wurde ein oligo(dT)₁₈-Primer verwendet, der Bestandteil des Kits ist. Die Qualität und Menge der gewonnenen cDNA wurde mithilfe einer PCR untersucht, in der ein Fragment der cDNA des Haushaltsgens β -TUBULIN amplifiziert wird. Kontaminationen mit genomischer DNA konnten am Auftreten einer weiteren, höhermolekularen Bande nach Agarosegelelektrophorese erkannt werden.

2.3.4. Semiquantitative PCR zur Expressionsanalyse

Zur Analyse der Restexpression von Genfragmenten in korrespondierenden T-DNA-Insertionsmutanten wurde Gesamt-cDNA aus Mutantenlinien und dem Wildtyp Col-0 hergestellt und mithilfe von semiquantitativer PCR untersucht. Die Primer wurden hierbei so gewählt, dass sie zur Amplifikation von Fragmenten vor, hinter und über die T-DNA-Insertion führten. Durch die Analyse der Produkte nach 28, 30, 32 und 35 Zyklen konnte so jeweils die Menge an amplifiziertem Fragment beim Wildtyp mit der jeweiligen Menge bei den untersuchten Mutanten verglichen werden. So konnte eine vollständige Expression des intakten Gens in der jeweiligen Mutante ausgeschlossen und die Expression von Fragmenten beurteilt werden. Eine Aufstellung aller verwendeten Primer und deren Kombinationen für entsprechende PCRs findet sich im Anhang der vorliegenden Arbeit (Tabellen 7 und 9).

2.3.5. Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Vor weiteren Klonierungsschritten bzw. vor einer Sequenzierung wurden PCR-Fragmente aufgereinigt. Dies wurde mithilfe des innuPREP PCRpure Kits (Analytic Jena) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte jeweils in 50 µl Elutionspuffer.

2.3.6. A-Tailing und Ligation mit pGEM®-T Easy

A-Tailing-Ansatz	7 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt
	1 µl	10x Puffer mit MgCl ₂
	0,2 µl	dNTPs (10 mM)
	0,2 µl	Biomaster-Taq (Biomaster)
	1,6 µl	ddH ₂ O

Für das A-Tailing von aufgereinigten PCR-Fragmenten wurde die Biomaster-Taq (Biomaster) verwendet. Dazu wurde der Ansatz 15 min bei 72 °C inkubiert. Die Ligation mit dem Vektor pGEM-Teasy (Promega) wurde mit der T4 DNA-Ligase (Fermentas GmbH) nach Herstellerprotokoll über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Das Plasmid pGEM®-T Easy ist für die Ligation eines PCR-Fragmentes mit A-Überhängen vorbereitet, da T-Überhänge am linearisierten Vektor vorhanden sind. Durch Ligation gewonnene Plasmide wurden zur Vermehrung in *E. coli* NEB5alpha (New England Biolabs) eintransformiert.

2.3.7. Transformation von *E. coli*

LB-Flüssigmedium	10 g/l	Bactotrypton (Duchefa)
	5 g/l	Hefeextrakt (Duchefa)
	10 g/l	NaCl
		ddH ₂ O

LB-Festmedium	17,5 g/l	Plant Agar (Duchefa)
		LB-Flüssigmedium

LB-Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden *E. coli* NEB5alpha (New England Biolabs) mit diesen transformiert. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz oder 1 µl aufgereinigtem Plasmid vermischt. Nach einer Inkubationszeit von

20 min auf Eis wurde ein Hitzeschock von 90 s bei 42 °C durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend 2 min auf Eis abgekühlt und mit 400 µl vorgewärmtem LB-Medium versetzt. Die Suspension wurde unter Schütteln 1 h bei 37 °C inkubiert und dann 100 - 200 µl Transformationsansatz auf LB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert. Für das Vektorsystem pGEM-Teasy wurde LB-Festmedium mit 100 mg/l Ampicillin, 25 mg/l IPTG und 25 mg/l X-Gal (Duchefa) verwendet. Dieses Vektorsystem enthält die Möglichkeit zur Blau-Weiß-Selektion und so konnte der Ligationserfolg anhand der Anzahl weißer Kolonien validiert werden. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden einzelne Kolonien auf eine weitere LB-Festmediumplatte mit Antibiotikazusatz übertragen und über PCR analysiert. Dazu wurde die Pipettenspitze nach dem Überpicken in den PCR-Ansatz überführt und die Bakterienreste durch Auf- und Abpipettieren im Ansatz verteilt.

2.3.8. Plasmidpräparation im Kleinstmaßstab

Zur Vermehrung der Plasmide in *E. coli* wurde in LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikazusatz eine Übernachtskultur angesetzt. Für das Vektorsystem pGEM-Teasy wurde LB-Flüssigmedium mit Carbenicillin verwendet. Dazu wurden *E. coli* von Platte mithilfe einer Pipettenspitze in das Medium überführt und die Probe über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Je 5 ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 6000 g in einem Mikrozentrifugiergefäß geerntet. Die Plasmide wurden daraus mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB Biotechnologie GmbH) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und je in 50 µl ddH₂O eluiert. Die Menge an gewonnenem Plasmid wurde mithilfe des Qubit® DNA BR Assay Kits am Qubit®-Fluorometer (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben bestimmt.

2.3.9. Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmente wurde von der Firma GATC durchgeführt. Hierfür wurde aufgereinigtes Plasmid bzw. PCR-Produkt mit den zu verwendenden Primern eingeschickt. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen wurde mit dem Programm Seqman™ II (Version 5.03) durchgeführt.

2.4. Bioinformatische Arbeiten

2.4.1. Sequenzanalyse zur Bestimmung von Homologen

Zur Identifizierung von Homologen menschlicher Proteine in *Arabidopsis* wurde eine WU-BLAST 2 Suche über die Datenbank der *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR; www.arabidopsis.org, letzter Zugriff am 17.10.2011) durchgeführt. Außerdem wurden potentielle Kandidatengene mithilfe des Programms InParanoid7 (Ostlund *et al.* 2010) validiert. In Paranoid vergleicht Proteome vollständiger eukaryotischer Genome plus dem von *E. coli* und identifiziert paarweise orthologe Beziehungen. T-DNA-Insertionsmutanten wurden über die Suchmaschine T-DNA Express des *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>, letzter Zugriff am 17.10.2011) identifiziert. Des Weiteren wurde die Datenbanken PLAZA 2.0 (Proost *et al.* 2009) und Ensembl Genomes (Kersey *et al.* 2010) verwendet um Mitglieder von Genfamilien und Homologe in anderen Spezies zu identifizieren. Sequenzen weiterer Spezies wurden von den Datenbanken des NCBI bzw. Ensembl Genomes (Kersey *et al.* 2010) erhalten. Zum Vergleich mehrerer Sequenzen wurde das Programm Clustal W2 (Larkin *et al.* 2007; Goujon *et al.* 2010) mit Standardeinstellungen verwendet. Zur Erstellung von Stammbäumen wurde das Programm MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011) verwendet.

2.4.2. Sequenzanalyse von Proteinen

Proteinsequenzen wurden mithilfe des Programms InterProScan (Zdobnov und Apweiler 2001; Quevillon *et al.* 2005) analysiert, um funktionelle Domänen zu identifizieren und so einen besseren Einblick in mögliche Proteinfunktionen erhalten zu können. Des Weiteren wurde von der Firma BioGenes das Programm Antheptrot (Deleage *et al.* 2001) benutzt, um mögliche Epitope aus Proteinsequenzen vorherzusagen und so geeignete Fragmente zu bestimmen, welche für die Immunisierung zur Gewinnung von Antikörpern verwendet werden sollten.

2.5. Immunologische Arbeiten

2.5.1. Immunisierung zur Gewinnung von Antikörpern

Die in dieser Arbeit beschriebenen eigenen polyklonalen Antikörper wurden im Auftrag des Lehrstuhls Botanik II bei den Firmen BioGenes und Metabion hergestellt.

Nach der Auswahl geeigneter Peptide wurde die Peptidsynthese und anschließende Immunisierung für den RTEL1-N-Peptidantikörper und den FANCM-Peptidantikörper bei BioGenes in Auftrag gegeben. Die Peptide wurde an das Protein LPH (*Limulus polyphemus* Hämocyanin) als Carrier gekoppelt und damit jeweils eine Ziege immunisiert. Das Immunisierungsprotokoll ist in Abbildung 7 dargestellt. Das so erhaltene Serum wurde von BioGenes einem ELISA-Titertest unterzogen. Der RTEL1-N-Peptidantikörper wurde zusätzlich antigenspezifisch aufgereinigt. Dazu wurden die Herstellung der Antigensäule und die Aufreinigung bei BioGenes in Auftrag gegeben. Die Aufreinigung wurde von BioGenes gemäß dem firmeneigenen Protokoll durchgeführt. Der aufgereinigte Antikörper und das Restserum für RTEL1-N bzw. das Serum von FANCM wurden nach der Anlieferung aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Ein Teilvolumen des aufgereinigten Antikörpers wurde mit Glycerin auf eine Endkonzentration von 50 % versetzt und bei -20 °C gelagert.

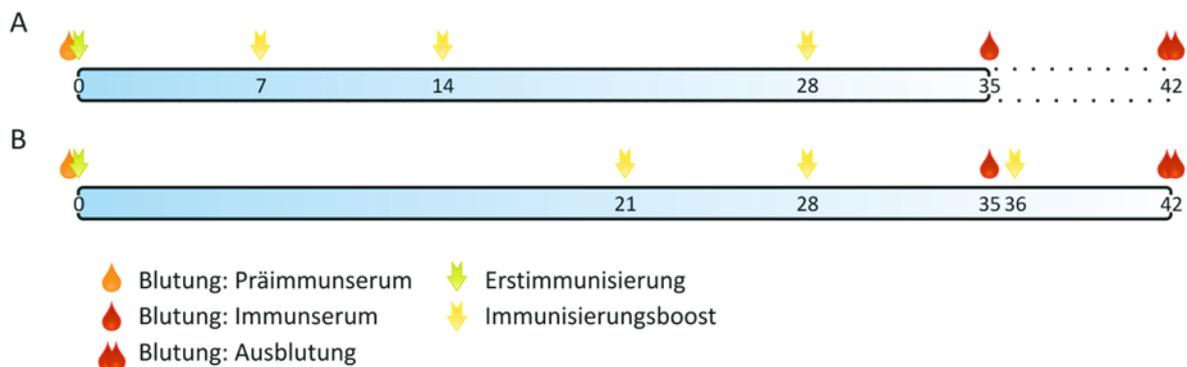


Abbildung 7: Immunisierungsschemata zur Herstellung der Antikörper. (A) 35-Tage-Immunisierungsschema für Ziege von BioGenes. Im Normalfall wird keine Ausblutung vorgenommen, aufgrund von Krankheit der Ziege für den RTEL1-N-Antikörper wurde dies jedoch am Tag 42 durchgeführt. (B) 42-Tage-Immunisierungsschema für Kaninchen von Metabion. Kaninchen werden zur Gewinnung einer ausreichenden Menge Serum standardmäßig ausgeblutet.

Für die Herstellung des RTEL1-C-Proteinantikörpers wurde die Proteinsynthese und Aufreinigung durch die Firma Primm in Kooperation mit der Firma Metabion durchgeführt. Dafür wurde ein geeigneter Fragmentbereich ausgewählt und das entsprechende ORF-Fragment aus cDNA kloniert. Daraus wurden bei Primm verschiedene Expressionvektoren generiert und eine ausreichende Menge Protein hergestellt. Dieses wurde zur

Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Abbildung 7 zeigt das von Metabion verwendete Immunisierungsprotokoll. Das gewonnene Serum wurde einem ELISA-Titertest unterzogen. Nach der Anlieferung wurde das Serum aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6. Biochemische Arbeiten

2.6.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Acrylamid-Lösung	37,5:1	(30 % T, 2,67 % C)
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M	Tris-HCl (pH 8,8) ddH ₂ O
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M	Tris-HCl (pH 6,8) ddH ₂ O
SDS-Lösung	10 %	SDS ddH ₂ O
APS-Lösung	10 %	Ammoniumpersulfat ddH ₂ O
Bromphenolblau	1 %	Bromphenolblau ddH ₂ O
Laufpuffer (10x)	0,25 M 1,92 M 1 %	Tris-HCl (pH 8,3) Glycin SDS ddH ₂ O
Probenpuffer (2x)	0,125 M 2 % 10 % 0,01 % 10 %	Tris-HCl (pH 6,8) SDS Glycerin Bromphenolblau Thioglycerin ddH ₂ O
Coomassie-Lösung A	2 % 10 %	ortho-Phosphorsäure (85%) Ammoniumsulfat ddH ₂ O
Coomassie-Lösung B	5 %	SERVA Blue CBB-G250 (Serva) ddH ₂ O

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde SDS-Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) nach Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970). Die Gelelektrophorese wurde mit dem

Perfect Blue Doppelgelsystem Twin ExW S (PEQLAB Biotechnologie GmbH) durchgeführt. Tabelle 3 zeigt exemplarisch ein Rezept für das Gießen eines 10 %-SDS-Acrylamidgels. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge 2x-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 98 °C denaturiert. Es wurde jeweils ein Probenvolumen von 30 µl pro Spur geladen. Als Größenmarker wurde je ein Volumen von 2,5 µl Marker aus der PageRuler™ Protein Ladder Kollektion (Fermentas GmbH) geladen. Die Gelelektrophorese wurde bei 30 mA konstant pro Gel im Sammelgelbereich bzw. bei 45 mA konstant pro Gel im Trenngelbereich unter Wasserkühlung auf 10 °C durchgeführt. Die Coomassie-Färbelösung wurde aus 78,4 ml Coomassie-Lösung A und 1,6 ml Coomassie-Lösung B angesetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Kurz vor Verwendung wurde noch 20 ml Ethanol (vergällt) zugegeben. Die Gele wurden nach abgeschlossener Elektrophorese entweder für die Detektion einzelner Proteine geblottet oder zur Visualisierung aller Proteine mit Coomassie-Färbelösung über Nacht unter Schütteln bei Raumtemperatur gefärbt. Coomassie-gefärbte Gele wurden durch mehrmaliges Waschen in ddH₂O entfärbt. Die Dokumentation erfolgte durch Scannen der Gele in einem Durchlichtscanner.

Tabelle 3: Rezept für Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE nach Laemmli. Die Tabelle zeigt exemplarisch die Rezepte für das Gießen von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE im Perfect Blue Doppelgelsystem Twin ExW S (PEQLAB).

	5 % Sammelgel	10 % Trenngel
ddH₂O	8,66 ml	12,94 ml
Acrylamid-Lösung	2,95 ml	10,66 ml
Sammelgelpuffer	3,94 ml	
Trenngelpuffer		7,91 ml
SDS-Lösung	160 µl	320 µl
APS-Lösung	79 µl	160 µl
TEMED	16 µl	15 µl
Bromphenolblau	20 µl	

2.6.2. Western Blot

Anodenpuffer I	0,3 M	Tris-HCl (pH 9,4)
	10 %	Ethanol (vergällt)
		ddH ₂ O
Anodenpuffer II	25 mM	Tris-HCl (pH 9,4)
	10 %	Ethanol (vergällt)
		ddH ₂ O
Kathodenpuffer	25 mM	Tris-HCl (pH 9,4)
	0,04 M	Aminocaproat
	10 %	Ethanol (vergällt)
		ddH ₂ O

Zur spezifischen Detektion von über SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen wurden diese aus dem Gel auf die Oberfläche einer PVDF-Membran elektrogeblottet. Dazu wurde die Membran durch Spülen mit vergälltem Ethanol hydrophilisiert, 2 min in ddH₂O gespült und anschließend 5 min in Anodenpuffer II inkubiert. Das SDS-Gel wurde direkt nach der Elektrophorese für 10 min in Kathodenpuffer inkubiert. Dann wurde der Blotstapel luftblasenfrei gemäß Abbildung 8 aufgebaut. Überstehende Membranfläche wurde dabei mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) abgedeckt. Die anzulegende Stromstärke in mA wurde über die Formel $I = 0,8 * \text{Membranfläche (in cm}^2\text{)}$ berechnet und für 2 h geblottet. Anschließend wurde die Membran luftgetrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

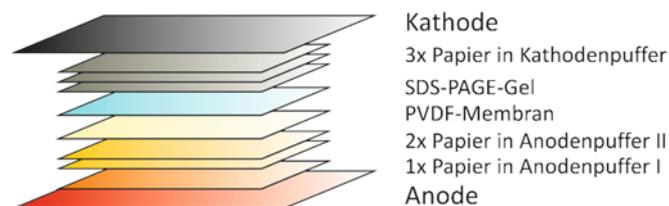


Abbildung 8: Aufbau des Western Blot Stapels. Die Papiere wurden in den jeweiligen Puffern getränkt und der Stapel luftblasenfrei aufgebaut.

2.6.3. Entwicklung des Western Blot

TBS-Puffer	10 mM 0,15 M	Tris-HCl (pH 8,0) NaCl ddH ₂ O
TBS-T-Puffer	0,1 %	Tween-20 TBS-Puffer
Blockierlösung	10 %	Roti-Block (Roth) ddH ₂ O
Antikörperlösung	1 % 0,25 % 0,02 %	IgG-freies BSA (Dianova) Tween 20 NaN ₃ TBS-Puffer
AP-Puffer	0,1 M 0,1 M 5 mM	Tris-HCl (pH 8,8) NaCl MgCl ₂ ddH ₂ O
BCIP-Lösung	50 g/l	BCIP DMF

NBT-Lösung	75 g/l 70 %	NBT DMF ddH ₂ O
Färbelösung	20 ml 60 µl 10 µl	AP-Puffer BCIP-Lösung NBT-Lösung

Zur Entwicklung des Blots wurde die Membran mit Ethanol (vergällt) befeuchtet und für 5 min mit 5 ml TBS-Puffer gewaschen. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot für 1 h mit 5 ml Blockierlösung inkubiert und danach wiederum dreimal für 5 min mit 5 ml TBS-T-Puffer gewaschen. Die Primärantikörperinkubation erfolgte für 1 h mit 5 ml der spezifischen Verdünnung des Primärantikörpers in Antikörperlösung. Anschließend wurde wiederum dreimal für 5 min mit 5 ml TBS-T-Puffer gewaschen. Die Sekundärantikörperinkubation erfolgte für 30 min mit 5 ml der spezifischen Verdünnung des Sekundärantikörpers in Antikörperlösung. Als Sekundärantikörper wurden Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelter Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper (Dianova; 1:20.000) und AP-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Sigma; 1:80.000) verwendet. Nach der Sekundärantikörperinkubation wurde zweimal 5 min mit 5 ml TBS-T-Puffer und zweimal 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte im Dunkeln durch Übergießen mit 5 ml Färbelösung. Das Abstoppen der Färbung erfolgte durch mehrmaliges Waschen des Blots mit ddH₂O. Der Blot wurde luftgetrocknet und im Dunkeln gelagert. Zur Dokumentation wurde der Blot in einem Scanner mit Auflichteinheit gescannt.

2.6.4. Crosslinking von Proteinen

Phosphatpuffer (10x)	0,1 M 18 mM 1,37 M 27 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4) KH ₂ PO ₄ NaCl KCl
BSA-Lösung	0,1 mM	IgG-freies BSA (Dianova) 1x-Phosphatpuffer
MBS-Lösung	10 mM	MBS (Sigma) DMSO
Peptidlösung	2 g/l	Peptid ddH ₂ O
Cysteinlösung	0,1 M	Cystein 1x-Phosphatpuffer

Zur Evaluation der gewonnenen Antipeptidantikörper wurde das jeweilige Peptid über den Crosslinker MBS an IgG-freies BSA (Dianova) gekoppelt um die Crosslinkingprodukte dann gelelektrophoretisch aufzutrennen und zu blotten. Es wurden 500 µl BSA-Lösung mit 50 µl MBS-Lösung versetzt und 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Lösung wurde über eine illustra NAP™-5-Säule (GE Healthcare) gemäß Herstellerangaben in 1x-Phosphatpuffer umgepuffert. Anschließend wurden je 100 µl umgepufferte MBS-aktivierte BSA-Lösung mit einem zweifach molaren Überschuss von Peptid versetzt und 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Cysteinlösung gequenched. Die Peptid-gekoppelten BSA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.7. Zytologische Arbeiten

2.7.1. Chromatinpräparation in der Meiose von *Arabidopsis thaliana*

Fixierlösung	75 % Ethanol 25 % Eisessig
Citratpuffer	0,01 M Na-Citrat (pH 4,5) 0,01 M Zitronensäure ddH ₂ O
Verdaulösung	1 % Cellulase (Sigma C1794) 1 % Pectolyase (Sigma P5936) Citratpuffer
	Die Verdaulösung wurde zu 333 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
Essigsäurelösung	60 % Essigsäure ddH ₂ O
DAPI-Lösung	VECTASHIELD Mounting medium with DAPI (Vectashield Laboratories)

Die angewandte Methode zur Chromatinpräparation in der Meiose basiert auf den Beschreibungen von Armstrong *et al.* (2009). Zur Präparation wurden Primärblütenstände drei bis vier Wochen alter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verwendet. Für die Präparation homozygot steriler Mutanten wurde Saatgut aus der Selbstung heterozygoter Mutanten ausgebracht. Die Auswahl homozygoter Mutanten erfolgte dann nach Genotypisierung mittels PCR (siehe Kapitel 2.3.1). Alle weiteren Mutanten bzw. der Wildtyp konnten homozygot vermehrt und direkt zur Präparation eingesetzt werden. Die Primärblütenstände wurden in Fixierlösung in ein Schnappdeckelglas gegeben. Die Lösung wurde nach zwei bis

drei Stunden gewechselt und die fixierten Blüten wurden bei Raumtemperatur gelagert. Zur Präparation wurden drei bis vier Primärblütenstände in etwas Fixierlösung in einen schwarzen Färbenapf überführt. Mithilfe einer Uhrmachpinzette wurden die Knospen unter dem Binokular vereinzelt. Alle Knospen mit gelblichen Antheren wurden verworfen. Die Fixierlösung wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und durch Citratpuffer ersetzt. Die Knospen wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit einer flexiblen Präpariernadel wurden schwimmende Knospen untergetaucht. Der Citratpuffer wurde gewechselt und es wurde für weitere 5 min gewaschen. Die Verdauung wurde mit 667 μ l Citratpuffer verdünnt. Nach Zugabe der verdünnten Verdauung wurde der Färbenapf mit Parafilm abgedeckt und in eine Feuchtekammer überführt. Der Verdau wurde für 75 min bei 37 °C durchgeführt. Die Verdauung wurde anschließend abgesogen und durch Zugabe von eiskaltem sterilem destilliertem Wasser wurde der Verdau abgestoppt. Die Knospen wurden nach Größe sortiert. Es wurden jeweils 4 gleich große Knospen in einem geringen Volumen Wasser auf einen polierten Objektträger überführt und mit einer flexiblen Präpariernadel zu einer möglichst homogenen Suspension zerquetscht. Nach Zugabe von 7 μ l Essigsäurelösung wurde die Suspension kurz mit der flexiblen Präpariernadel gerührt und dann ca. 30 s auf einem Heizblock bei 45 °C inkubiert. Zur weiteren Fixierung wurde mit 1 ml Fixierlösung der Suspensionstropfen auf dem Objektträger umkreist und mit einem weiteren ml Fixierlösung abgespült. Das Präparat wurde mit einem Fön getrocknet. Es wurde 12 μ l DAPI-Lösung zugegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Zur Verteilung der DAPI-Lösung und zum Entfernen überschüssiger Lösung wurde das Präparat auf einem Küchentuch sanft gequetscht. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Die Präparate wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops AxioImager.M1 (Carl Zeiss AG) untersucht und Aufnahmen wurden mit der AxioCam MR gemacht. Die Aufnahmen wurden mit AxioVision (Version 4.8.1) und CorelDraw X5 bearbeitet.

2.7.2. Chromatinpräparation in der Meiose von *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

Für die Chromatinpräparation in Micro-Tom-Knospen wurde die in Kapitel 2.7.1 beschriebene Methode (nach Armstrong *et al.* 2009) angepasst. Es wurden Knospen von drei bis vier Wochen alten Micro-Toms fixiert. Die Knospen wurden analog zu 2.7.1 gewaschen und verdaut. Die Länge der Knospen wurde mithilfe einer Neubauer-improved Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) bestimmt. Für ein Präparat wurde jeweils eine Knospe von 2,5 bis 3,0 mm Länge verwendet und daraus mithilfe einer Uhrmacherpinzette die Antheren isoliert. Diese wurden auf einen polierten Objektträger überführt und mit einer flexiblen

Präpariernadel zu einer möglichst homogenen Suspension zerquetscht. Anschließend wurde die Präparation und Untersuchung wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben weiter durchgeführt.

2.7.3. Immunlokalisation in der Meiose von *Arabidopsis thaliana*

Phosphatpuffer (10x)	0,1 M NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4) 18 mM KH ₂ PO ₄ 1,37 M NaCl 27 mM KCl
Verdauungslösung	0,4 % Cytohelikase (Sigma C8274) 1,5 % Saccharose 1 % Polyvinylpyrrolidon (Sigma MW 40000) ddH ₂ O Die Verdauungslösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
Lipsol-Lösung	0,1 % Lipsol ddH ₂ O
Formaldehydlösung	4 % Formaldehydlösung (pH 8,0) ddH ₂ O Die Formaldehydlösung wurde für maximal 1 Woche bei 4 °C gelagert.
Waschlösung	0,1 % Triton-X-100 1x-Phosphatpuffer
Blockierlösung	1 % IgG-freies BSA (Dianova) 1x-Phosphatpuffer
Antikörperlösung	1 % IgG-freies BSA (Dianova) Waschlösung
DAPI-Lösung	VECTASHIELD Mounting medium with DAPI (Vectashield Laboratories)

Die angewandte Methode zur Immunlokalisation in der Meiose basiert auf den Beschreibungen von Armstrong *et al.* (2009). In Tabelle 4 findet sich eine Übersicht der verwendeten Primärantikörper, Tabelle 5 zeigt alle verwendeten Sekundärantikörper. Zur Präparation wurden Primärblütenstände drei bis vier Wochen alter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verwendet. Die Auswahl homozygoter steriler Mutanten erfolgte nach Genotypisierung mittels PCR (siehe Kapitel 2.3.1), alle weiteren Mutanten bzw. der Wildtyp konnten homozygot vermehrt und direkt zur Präparation eingesetzt werden. Pro Präparat wurden drei bis fünf Primärblütenstände verwendet. Mit einer Uhrmacherpinzette wurden die Blütenstände abgetrennt und zur Präparation unter dem Binokular auf ein angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Nach der Vereinzelung der Knospen wurden diejenigen zur weiteren Präparation ausgewählt, die 0,3 bis 0,6 mm groß waren und eine rundliche

Form hatten. Diese wurden mithilfe der Pinzetten geöffnet und die Antheren herauspräpariert. Die Isolierung der Antheren sollte nicht länger als 20 min dauern. Auf einen polierten Objektträger wurden 5 µl Verdauungslösung für die Immunlokalisation vorgelegt und die isolierten Antheren darin überführt. Mit einem abgerundeten Messingstab wurden die Antheren durch sanftes Klopfen zerquetscht. Nach einer Minute wurden nochmals 5 µl Verdauungslösung hinzupipettiert und für weitere 30 Sekunden geklopft. Dann wurde die Suspension auf dem Objektträger für zwei weitere Minuten bei 37 °C in einer Feuchtekammer inkubiert. Zur Suspension wurden 10 µl Lipsol-Lösung gegeben und für eine Minute mit einer flexiblen Präpariernadel gerührt. Zur Fixierung wurden 20 µl Formaldehyd-Lösung hinzupipettiert und die Suspension mithilfe der Pipettenspitze auf Deckglasgröße ausgebreitet. Das Präparat wurde mindestens 90 min luftgetrocknet. Mit einem Glasschreiben wurde die Lage der getrockneten Präparation auf dem Objektträger markiert. Der Objektträger wurde anschließend in eine Küvette mit Waschlösung überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Waschlösung wurde gewechselt und für weitere 5 min inkubiert. Die Blockierung erfolgte durch Zugabe von 100 µl Blockierlösung und Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer. Nach der Zugabe der Lösung wurde der Objektträger mit Parafilm blasenfrei abgedeckt. Nach der Inkubation wurde der Parafilm mit einer Pinzette abgenommen und der Objektträger kurz auf Küchenpapier abgeklopft. Die Primärantikörper wurden in 50 µl Antikörperlösung verdünnt und auf die Präparation gegeben. Die Inkubation erfolgte nach Abdeckung mit Parafilm über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtekammer. Am nächsten Tag wurde das Präparat wiederum zwei Mal für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Sekundärantikörper in 50 µl Antikörperlösung verdünnt und auf den Objektträger pipettiert. Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Sekundärantikörperinkubation erfolgte nach Abdeckung mit Parafilm für 30 min bei 37 °C in einer Feuchtekammer. Nach zwei weiteren Waschschrritten für 5 min bei Raumtemperatur wurden 12 µl DAPI-Lösung auf die Präparation pipettiert und ein Deckglaschen aufgelegt. Durch sanftes Drücken auf Küchenpapier wurde die DAPI-Lösung verteilt und überschüssige Lösung entfernt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper. Aufgeführt sind alle verwendeten Primärantikörper. Alle Antikörper, bis auf die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten, wurden freundlicherweise von F. Christopher H. Franklin (School of Biosciences, University of Birmingham) zur Verfügung gestellt.

Antigen	aus Spezies	Beschreibung	Verdünnung
ASY1	Kaninchen	Armstrong <i>et al.</i> 2002	1:500
ZYP1	Kaninchen	Higgins <i>et al.</i> 2005	1:500
RAD51	Kaninchen	Mercier <i>et al.</i> 2003	1:500
DMC1	Kaninchen	Sanchez-Moran <i>et al.</i> 2007	1:500
MSH4	Ratte	Higgins <i>et al.</i> 2004	1:500

Bei gleichzeitiger Verwendung von Primärantikörpern aus derselben Spezies wurden die Inkubationsschritte mit beiden Antikörpern aufeinanderfolgend ausgeführt. Der erste Primärantikörper wurde mit Fluoreszenz-markierten Fab-Fragmenten in einer Verdünnung von 1:50 als erstem Sekundärantikörper detektiert. Nach einer zusätzlichen Fixierung mit 100 µl Fixierlösung für 12 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer wurde drei Mal für 5 min gewaschen und anschließend die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper ausgeführt. Dieser wurde anschließend mit dem zweiten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 detektiert.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper. Aufgezählt sind jeweils die Antikörperspezies, der an den jeweiligen Antikörper konjugierte Fluoreszenzfarbstoff und die Bezugsquelle.

Antikörperspezies	Fluoreszenzfarbstoff	Bezugsquelle
Ziege-anti-Kaninchen	DyLight™ 488	Dianova
Esel-anti-Kaninchen-Fab Fragment	DyLight™ 549	Dianova
Ziege-anti-Ratte	DyLight™ 549	Dianova

Die Präparate wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops AxioImager.M1 (Carl Zeiss AG) untersucht und Aufnahmen wurden mit der AxioCam MR gemacht. Die Aufnahmen wurden mit AxioVision (Version 4.8.1) und CorelDraw (Version X5) bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1. Das SPG48-Homolog von *Arabidopsis thaliana*

Slabicki *et al* identifizierten (2010) das Protein SPG48 im Menschen und postulierten, dass es als putative Helikase eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur über homologe Rekombination ausübt. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob auch in *Arabidopsis thaliana* ein Homolog dieses Proteins konserviert und ob dieses ähnlich zum menschlichen Homolog auch eine Funktion in der homologen Rekombination ausübt.

3.1.1. Identifikation des SPG48-Homologs in *Arabidopsis thaliana*

Eine über die Datenbank der TAIR durchgeführte WU-BLAST-Suche mit der Sequenz des menschlichen SPG48-Proteins (Accession-Nr. O43299.2) führte zur Identifizierung des Gens At3g15160 als Homolog zum menschlichen *SPG48*. Dies wurde durch eine Analyse mit InParanoid weiter bestätigt.

Über die Datenbank PLAZA konnten auch in anderen Pflanzen wie *Oryza sativa* und *Vitis vinifera* Homologe zu AtSPG48 identifiziert werden. Die Sequenzen weiterer Homologe aus anderen Reichen des Lebens wurden über die Datenbank Ensemble Genomes erhalten. Abbildung 9 zeigt einen Stammbaum von SPG48-Homologen aus diversen Taxa, das über ein Clustal W2-Alignment (Larkin *et al.* 2007; Goujon *et al.* 2010) in Mega 5.0 (Tamura *et al.* 2011) erstellt wurde. Der Stammbaum wurde über die *Maximum Parsimony*-Methode berechnet und entspricht der bekannten Phylogenie mit einer Unterteilung der beinhalteten Arten in Amoebozoa – hier mit dem Vertreter *Dictyostelium discoideum* aus der Klasse der

Schleimpilze –, Opisthokonta – darunter die Metazoen – und Plantae (Parfrey *et al.* 2006; Yoon *et al.* 2008; Parfrey *et al.* 2010). Unter den Metazoen kann die Seeanemone *Nematostella vectensis* klar von den Vertebraten unterschieden werden. Hier wiederum sind neben dem Menschen die Säugetiere Maus und Rind von den übrigen Vertebraten Huhn, Krallenfrosch und Zebrafisch separiert. Auch im Pflanzenreich entspricht die Darstellung der Unterteilung in Monokotyledonen – hier Reis – und Eudikotyledonen – hier neben *Arabidopsis* noch Pappel und Wein.

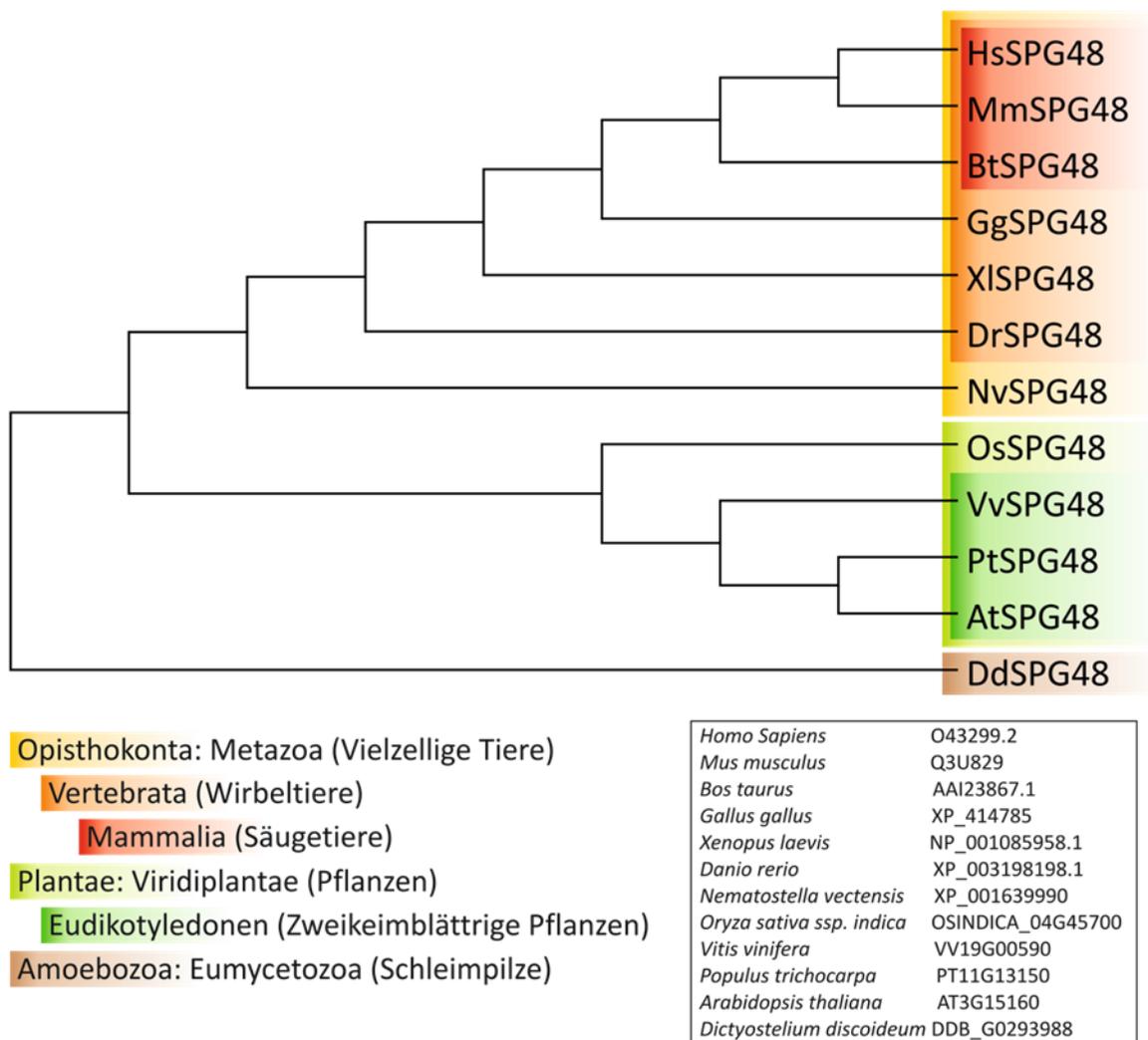


Abbildung 9: Stammbaum von SPG48-Homologen in verschiedenen Organismen. Für die Erstellung des Baums nach der Maximum Parsimony-Methode mit Mega 5.0 wurden Sequenzen verschiedener SPG48-Homologe mit Clustal W2 aliniert. Die Sequenzdaten wurden unter den angegebenen Accessionnummern über die Datenbanken PLAZA und Ensemble Genomes erhalten. *P. discoideum* wurde als *Outgroup* definiert.

Aus cDNA des Wildtyps Col-0 wurde das offene Leseraster von AtSPG48 amplifiziert und sequenziert. Dieses entspricht der Vorhersage der Intron-Exon-Struktur, die über die Datenbank von TAIR erhalten werden kann. Das Gen ist in 16 Exons und 15 Introns gegliedert und umfasst von Start- bis Stoppcodon von 1689 Basen. Es codiert für ein Protein von 562 Aminosäuren Länge mit einer molekularen Masse von 62,4 kDa (siehe auch Abbildung 12). Außerdem wurden 5' und 3'-UTR sequenziert und damit Start und Stopp des Transkripts bestätigt.

Wie schon von Slabicki *et al.* (2010) für das menschliche Homolog beschrieben, konnten auch für AtSPG48 über InterProScan keine funktionellen Domänen anhand der Aminosäuresequenz ermittelt werden. Slabicki *et al.* identifizierten strukturelle Homologien von HsSPG48 mit der Helikase C-Domäne von Helikasen der Superfamilie 2, die in die DNA-Reparatur involviert sind, wie UvrB aus *B. subtilis* und RecG aus *T. maritima*. Über ein Alignment von HsSPG48 mit den genannten Helikasen der Superfamilie 2 konnten dann für HsSPG48 Helikasemotive zugewiesen werden. Daher wurde eine Helikasefunktion für HsSPG48 postuliert. Zur Ermittlung einer putativen Helikasedomäne in AtSPG48 wurde ein Alignment der zur Stammbaumdarstellung verwendeten Vertebraten- und Pflanzenhomologe erstellt. Es konnten über alle Sequenzen konservierte Bereiche ermittelt werden und diese den Helikasemotiven zugewiesen werden, die zuvor für HsSPG48 als Helikasemotive ermittelt wurden (Slabicki *et al.* 2010, siehe Abbildung 10). Die konservierten Bereiche konnten zudem vor und hinter den von Slabicki *et al.* beschriebenen Motiven erweitert werden. Außerdem wurden weitere konservierte Bereiche zwischen den Helikasedomänen Ia und II bzw. III und IV, sowie nach Helikasemotiv V identifiziert. Somit kann eine putative Helikasedomäne von AtSPG48 im Bereich der Aminosäuren 88 bis 516 postuliert werden (siehe Abbildung 11 im Vergleich mit dem menschlichen Homolog).

Auffallend ist im Vergleich der SPG48-Homologe aus Vertebraten und Pflanzen, dass die pflanzlichen Homologe im Allgemeinen etwas kürzer sind und ihnen der N-terminale Bereich der Vertebratenhomologe fehlt (exemplarisch für AtSPG48 und HsSPG48 dargestellt in Abbildung 11).

HsSPG48	LVLVDLVCQDPSFLYRSLSCALKHGRVGD PASVRLPLLAHFFLSHGEEAAVDSEAVY	389	
MmSPG48	SVLVDLVCQDPSFLYRTLSCALKHRRLGEDPGSERALVPLAQFFLNHGEEAAVDSEAVY	388	
BtSPG48	LVLVDLVCQDPSFLYRALPCVRALRTRLCGDTACVRLLLPIAQFFLNHGEEAAVDADAVC	353	
GgSPG48	AIMDIICKQDSSVYRAASFLLKIHGRISGDATYARALLPIAQFFLNHGEEAAVDSDAIY	420	
XlSPG48	ALLDIVCKQDVSYLALPLKLNHGRGLCTDLSLAPALLPLAQFFLNHSEVAAVDSEAVY	373	
DrSPG48	SIMDIICGEDPSVYRAFPCKIKALYGRNLGDFNAYARTLLPIAQFFLNHSEVAAVDSEAVF	390	Helikasemotiv I
VvSPG48	-SEDLIARVYP-QINKIFQRVSVLSQSTN--SYGLLLLAIQFFLDFGEVVLHADADPSL	105	
PtSPG48	-SEDLIARVYP-QINKLFRQSVLSQSTN--SYGLLLLAIQFFLDFGEVVLHADADPIL	109	
AtSPG48	-SDDLIARIYP-QFNKVFHRSVASLSQSESGASKGLLLAIQFFLDFGDMVHLHSDSPSL	104	
OsSPG48	PSDEMVARAFP-VMSKLFQRCAAAPTQSA--SSGVLILLTIQFFLDFGEAVLHADAGSL	112	
	::: : : : : * : * * : :		
HsSPG48	QHLEFTHIPVEQFHSPLAFEFIQFCRDNLHLFSGH-LSTLRLSFPNLFKFLAWNSSPPI	448	
MmSPG48	GQLLRGLPSERFHSPITLAFEVIFHCTHNALFDSSHFLSLLRSLFPPSLFKFLAWNSSPPI	448	
BtSPG48	QHLEFTHIPSEHFHSPILAFEFVQFCRDHLVLFSGN-LDLLRSTFPNLFKFLAWSSPPI	412	
GgSPG48	KHLFTDIPALQFHNSSLAFEFVLFCDNSQLLLET-SSIFRQSFNLFKFLAWNSSPPI	479	
XlSPG48	RHLFTKVPDLYHKPLFAFQFVRFCTNNSFLLEN-VEAFRGSFPLSKFLAWNSPMLV	432	
DrSPG48	COLFGHCPAEQFNEPILAFEFVQFCLLNSVLQDR-VANYRQSFNLFKFLAWNSSGLI	449	Helikasemotiv Ia
VvSPG48	RTFFRSCLSRFADPVVAKATLDFLIWNKKKILTSFPTLLPQFPPLLLKLIWNGEKLEK	165	
PtSPG48	RTFLRTCLSRFADPVVAKATLDFLNVNKKKILTSFPTLLPQFPPLMLKLIWNGEKLEK	169	
AtSPG48	RTFFRSCLSRFSDAAVAEATCEFLVNQRKLLASFPNLLPQFPPLLLKLIWNGEKLEK	164	
OsSPG48	RTFFRSCLSRFADPVAERTLEFLIANKTKILSSFPPTLLPQFPPLLLKLIANSGERIER	172	
	::: * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *		
HsSPG48	EFVALLPALVD-AGTALEMHLALDLPCLTAVLDLQIRSAAPAS-ERPLWDTS--LRVAFS	504	
MmSPG48	EFVLLPALVD-AGTAVEMHLALDLPCLTAAALDQIRSAQTPS-ERLLWDIS--LRVAFS	504	
BtSPG48	EFVALLPVLD-AGTAVEMHLALDLPCLTAAALDQIRSAQAS-ERPLWDVS--VRVAFG	468	
GgSPG48	EFVLLPPLLD-AGTAIEIFHLALDLPCLTAAALDQIRSAQAS-ERPLWDVS--VRVAFG	536	
XlSPG48	EFLALLPALIS-PDSALEIHLHLALDLPCLTAAALEIQR-SCLVVS-DKTVDVDS--VVPSS	487	
DrSPG48	EFVLLPPLVA-PDTAIEIHLHLALDLPCLTAAALDQIRSAQAS-ERPLWDVS--VRVAFG	507	Helikasemotiv II
VvSPG48	SFLKVPFLGIS-PGSFLPLFSPVLDLPIVVALEKVERSSGGP--LIGSSIASIQKSTABE	222	
PtSPG48	SFMKIFPGLMSPGSFLPLFSPVLDLPIVVALEKVERSSGGP--LIGSSIASIQKSTABE	227	
AtSPG48	SFLKIFPGLIS-PGSFLPLFSPVLDLPIVVALEKVERSSGGSRVGGSSIASIQKSAABE	223	
OsSPG48	KFSEVLPMMSS-AGSFLPLFSLMDLPMVVALEKVERSSGT--LIGSSIASIQKSAABE	229	
	* : : * : : : : : : : * : : * : : * : : : :		
HsSPG48	CLEAFRDFQFOG-----LFQYLLRPAKAS--GATERLAP-LHQ	538	
MmSPG48	CLEAFQDFQFOG-----LFRHLLRPAKAS--GSTERLTP-LHQ	538	
BtSPG48	CLEALRDFQFOG-----LFQHLLRPAKAS--GTVERLTP-LHQ	502	
GgSPG48	CLEAFRNLYRS-----AFQYLLRVEVSSEDFQERLIP-LRQ	572	
XlSPG48	ATEAFRHLICRD-----VFQYLLRSETCPVPPDQQLSL-LHR	523	
DrSPG48	CLEAFRQFSYRQ-----IFLYLLRPEAGTGDTIDRLKE-LHQ	543	Helikasemotiv III
VvSPG48	MLLALMDHAYTGSTIGDGGDSESESDNAIDVADPFLFLLKDENDGLAERHWTSPGIAA	282	
PtSPG48	MLLALMDHAYTGSTIGDGGDSESESDNAIDVADPFLFLLKDENDGLPERHWTSPAMVA	287	
AtSPG48	MLLALMDHAYTGSTIGDGGDSESEDNNTIDVADPFLFLLKDENDGLAERHRASPTLNA	283	
OsSPG48	MLLALMDHAYTGSIAIEDAIGNAGSDSGLDLADPFLFLLKDENDGIAAKHWTSPITSS	289	
	* : : : : : : * : : : : : : : : :		
HsSPG48	LLQPMAGCA--RVAQCAQVPTLLQAFFSAVTQVADGSLINQLALLLLGRSDSLYPAPG	595	
MmSPG48	LVYPMASCA--RVTQCAEAQVPTLLQAFFSAVTQADGALINQLALLLERSDLYVPVQ	595	
BtSPG48	LLQPLASCA--RVLQCAQVPTLLRAFFAAVTQVEG-----	536	
GgSPG48	LLGGLASSP--RVVQCADTVVLLLEFFSVVSEFADASLINQLVVLVLRSDQLYEIPA	629	
XlSPG48	VLAELSSCP--RVLQCADI VPCVLQYFSITAKVADGGLISRLVVVLLERSGLLQSQD	580	
DrSPG48	ILADMAECP--RVVQCAQIVPVLVHYVNTVTEKADEKMMQLLVLLERCSLLYNIKT	600	Helikasemotiv IV
VvSPG48	ALQAAINTPQSDRLKQSLNMAPRVLDMYFAIALRDVNNSLICALPLIMTRNATIFPDKI	342	
PtSPG48	TLQATINTPQSDRLKQSLNMAPRVLDMYFAIALRDVNNSLICALPLIMTRNATIFPDKI	347	
AtSPG48	ALQAAASGPRSERMKQTLKIAFRLLDVFVSVTLRDANDSLICALPLIMTRNATIFPDKI	343	
OsSPG48	TLQAAVNSPQSDRLKQSLKMAPRFLTLTYFATALRDVNNSLICALIPVMSRYAAMPFDKV	349	
	* : * : * * : * * : *		
HsSPG48	YAAGVHVSLSQFLALCTLKPSLVVELARDLLEFLGVSNGLSRASLVTSVWVAIGEYLS	655	
MmSPG48	YEARVHVSLSQFLVLCKLPSLVVELSRELEFVGSVSIHSRASVFTCVWVAIGEYLS	655	
BtSPG48	YEADVHRVLSQFPALCKLHPPLVVERAKELLEFVGLGGPRSTGHMLTSVWVAIGEYLS	596	
GgSPG48	FKDDVHRVLSQFLVMLCKLHPAIITVEISKFLIFSGTVSNITQNKRPITFVWVAIGEYMS	689	
XlSPG48	YKDKVHVSLSQFLPHLCHLHPALVVELSRQLLDFVGTVSNITQSKPELFTVWVAIGEYVS	640	Helikasemotiv V
DrSPG48	FHVEVQRAFSTHLQALCKHHPPLVLDQSREILEFAGSPTNISYKEDFYTHVWVAIGEYLS	660	
VvSPG48	FSYEVKRRLLEFMAAFQSPDFIALKKPIMDRLEAYDSTAKTEALALQICWAIGEHGG	402	
PtSPG48	FSYEVKRRLLEFMAAFQSPDNFIALKKPIMDRLEAYDSTAKTEALALQICWAIGEHGG	407	
AtSPG48	FSHEIRRRLEFVLAAFQSPDNFIALKKPIMDRLEAYDSTAKTEALALQICWAIGEYGG	403	
OsSPG48	YSFEVVRKRLSDFILAAAFQSPDNFIALKKPITDRLEAHNDNPANTEALALQICWAIGEHGA	409	
	: : : : * : : : : : : : : : * : : : :		
HsSPG48	VTYDRRCTVEQINRFFEALALLFEVVTQCR--PSAALPRCPQVVTVLMTTLTKLASRSQ	713	
MmSPG48	VTWDRKRTAEQINRFFEALALLFEVVTQSR--PLADLPCCPEVVTALMTTLTKLASRSQ	713	
BtSPG48	VSWDRRCSAEQISRFFEALALLFEVVTQSR--PSAALPKCPQVITVLMTTLTKLASRSQ	654	
GgSPG48	VSYDRKRTVEQINRFETLEAVLFEVVTQVR--PQISVFNYPRAITVLMMAALTKLAARSQ	747	
XlSPG48	ISYDRKRTVEQVNRFFDVMTLLFEITQTR--GSSGVPFRSSPRVITVLMTTLTKLASRSQ	698	
DrSPG48	VSYPDRCRVELITSFPECLEAVLFEITQVR--QSASPPSFPRLITVLMTTLAKLATRSQ	718	
VvSPG48	GGASH--GDAARELFESLELLLYENLSSSRGLRQESALSSDGGATFRKSSQSRLLCFVV	459	
PtSPG48	GGASH--KDAARELFESLELLLYENLSTSRGLR-ESALRSSGGSSRKSQSRLLCFVV	463	
AtSPG48	GGASH--KEAARELFESLELLLYENLSSSRGLRQESGNGS----RRTTQSRLLCFVV	455	
OsSPG48	GGASH--KDVARELFENLELLLYENLSTSRGLSODTGFDPMGASSRKSQSRLLCFVV	466	
 : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *		
HsSPG48	DLIPRASLLSKMRTLAAHPATSSVHSEEGAEAIRTRATELLTLKMPVSAQVFLTEPSTE	773	
MmSPG48	DLIPRVSLFKMRTLAAHPATSSVHSEEGAEAIRTRASELLTLKMPVSAQVFLTEPAG	773	
BtSPG48	DLIPRVSLFKMRTLAAQSPAVGVHGEDDLGAVRTRATELLTLKMPVSAQVFLTEPSTE	714	
GgSPG48	DLIPRVSLFKMRTFVQSPAVTSVYCEEDREELIRTRATELMLKMPVSAQVFLTEPSTE	807	
XlSPG48	DLIPKVSFLSKMRSCVQSSAMISMYGEESEELIRTRATELMLKMPVSAQVFLTEPSTE	758	
DrSPG48	DLIPRASFLSKMRTLAAHPATSSVHSEEGAEAIRTRATELMLKMPVSAQVFLTEPSTE	778	
VvSPG48	TATAKLATYHRELLPRARVSLAKVARSRMSDARVWRRADHYLGLMNEPAICLSVLGFSRP	519	
PtSPG48	TATAKLASYHRELLPRARVSLGKVARSRISDVVWRRADHYLGLMNEPAICLSVLGFSRP	523	
AtSPG48	TATAKLATYHRELLPRARVALGKVKSRISDARVWRRADHYLGLMNEPAICLSVLGFSRV	515	
OsSPG48	TATAKLATFHNELLPRARVSLAKVARSRMSDARVWRRADHYLGLMNEPAICLSVLGFGSTA	526	
	* : : : : : : : : * : : * : : * : : * : : * : : *		

Abbildung 10: Alignment der SPG48-Homologe aus Vertebraten und Pflanzen. Umlegend um die von Slabicki *et al.* (2010) identifizierten Helikasemotiven (gelb) konnten erweiterte konservierte Bereiche (hellgelb) gefunden werden. Auch zwischen den Helikasemotiven Ia und II bzw. III und IV, sowie nach Helikasemotiv V konnten weitere konservierte Bereiche identifiziert werden (grün).

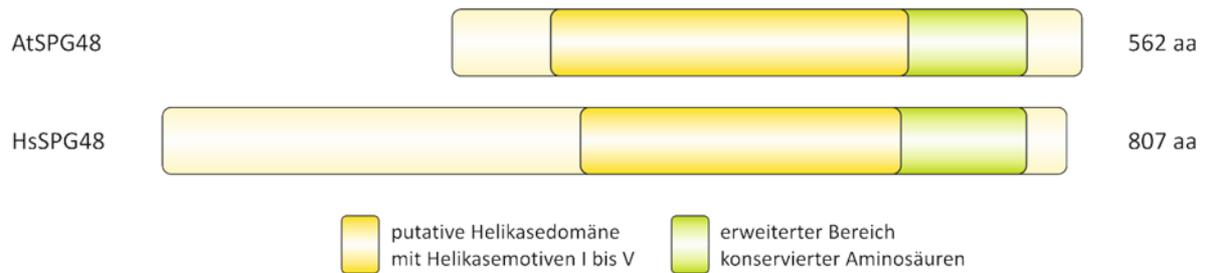


Abbildung 11: Darstellung der Proteine AtSPG48 und HsSPG48. Die durch Sequenzvergleich mit dem menschlichen Homolog ermittelte putative Helikasedomäne nimmt im Arabidopsis-Homolog eine zentrale Position ein, wohingegen sie im menschlichen Homolog eher C-terminal zu finden ist. Das menschliche Homolog zeigt zudem einen N-terminalen Bereich, zu dem in Arabidopsis keine Entsprechung zu finden ist – das Arabidopsis-Homolog ist um diesen Bereich kürzer als das menschliche Homolog.

3.1.2. Charakterisierung von *Atspg48* T-DNA-Insertionsmutanten

Zur Charakterisierung von SPG48 in *Arabidopsis thaliana* wurden über das Europäische Arabidopsis Stock Zentrum die entsprechende Mutante aus der Kollektion SALK (Alonso *et al.* 2003) bezogen. Die Linie wird im Folgenden als *spg48-1* (SALK_021747C) bezeichnet. Es wurde zudem eine zweite Mutante identifiziert, deren Untersuchung allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden konnte.

Zunächst wurde das erhaltene Saatgut auf Erde angezogen und die erhaltenen Pflanzen auf die T-DNA-Insertion hin durch PCR mit *Left Border*-spezifischen Primern genotypisiert. Zur Bestimmung der genauen Insertionsorte wurden die erhaltenen PCR-Produkte sequenziert. In Abbildung 12 ist die Intron-Exon-Struktur von SPG48 mit den eingezeichneten Insertionsorten der Mutantenlinie, sowie deren ermittelte exakte Sequenz um die Insertionsstelle angegeben. Die Insertion in *spg48-1* befindet sich in Intron 11. Es liegt mindestens eine doppelte Insertion vor, da beide Insertionsstellen von *Left Border* Sequenzen flankiert werden. In *spg48-1* entstand durch die Insertion eine Deletion von 9 Nukleotiden linksseitig flankiert von 58 Nukleotiden unbekannter Herkunft sowie einer um 78 Nukleotide verkürzten *Left Border*. Rechtsseitig wird die Insertion von von 7 Nukleotiden unbekannter Herkunft und einer um 93 Nukleotide verkürzten *Left Border* flankiert.

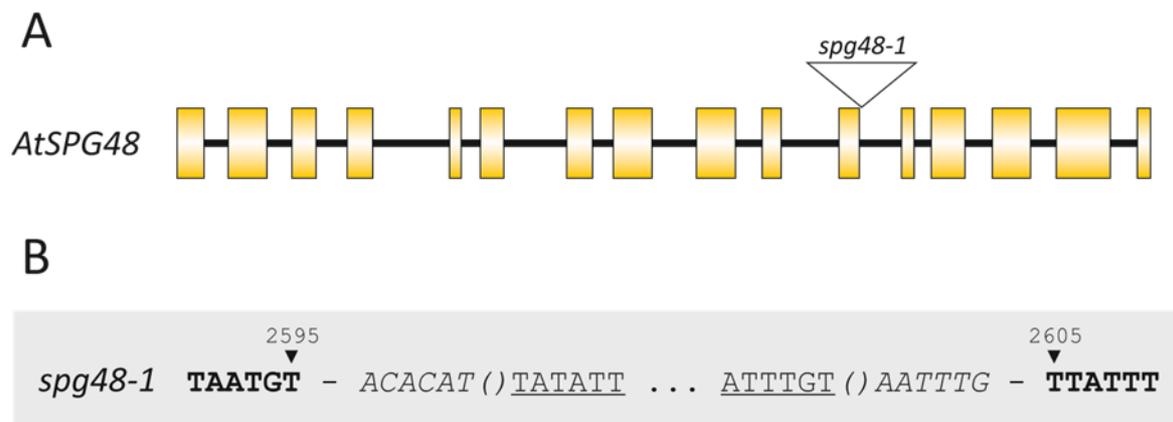


Abbildung 12: Intron-Exon-Struktur von *AtSPG48* und Sequenzanalyse von *spg48-1*. (A) Die Insertion von *spg48-1* liegt in Intron 11. (B) Sequenzanalyse der Insertionsstelle: *spg48-1* trägt mindestens eine doppelte Insertion, da *Left Border* Sequenzen an beiden Flanken gefunden wurden. Die genomische Sequenz ist fett dargestellt. Insertionen unbekannter Herkunft sind kursiv dargestellt, die Klammer deuten ausgelassene Nukleotide an. Die *Left Border* Sequenzen sind unterstrichen dargestellt und rechtsseitige und linksseitige Insertionsstelle sind durch Punkte getrennt. Außerdem ist die genauen Insertionsstelle bezogen auf den *AtSPG48*-ORF angegeben.

Um die Auswirkungen der T-DNA-Insertion auf die Expression von SPG48 in *spg48-1* zu prüfen, wurde eine semiquantitative Expressionsanalyse-PCR durchgeführt. Dazu wurden aus cDNA von Wildtyp und entsprechender Mutante jeweils der Bereich vor, nach und über die Insertionsstelle hinweg amplifiziert und die erhaltenen Fragmente nach 28, 30, 32 und 35 Amplifikationszyklen gelelektrophoretisch analysiert. Um von einer vergleichbaren Ausgangsmenge an cDNA ausgehen zu können, wurde zuvor die aus der Extraktion erhaltene RNA-Menge jeweils fluorometrisch quantifiziert und dann die zur cDNA-Synthese eingesetzte Menge angepasst. Dies wurde zudem durch die Amplifikation eines cDNA-Fragments des Haushaltsgens β -*TUBULIN* in allen zum Vergleich eingesetzten cDNA-Proben überprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 13 zeigt die für die semiquantitative Expressionsanalyse amplifizierten Bereiche und das Ergebnis beider gelelektrophoretischer Analysen. Es kann kein Fragment erhalten werden, welches die Insertion überspannt. Damit kann ein Spleißen ausgeschlossen werden, durch das die T-DNA entfernt werden würde. Dies ist prinzipiell immer dann möglich, wenn eine Insertion im Intron vorliegt. Für *spg48-1* ist eine Restexpression auf mRNA-Ebene vor und hinter der Insertion detektierbar, die allerdings schwächer ist, als im Wildtyp. So kann davon ausgegangen werden, dass in der Mutante kein vollständig intaktes Protein gebildet werden kann, jedoch eventuell N-terminale oder C-terminale Restfragmente gebildet werden könnten.

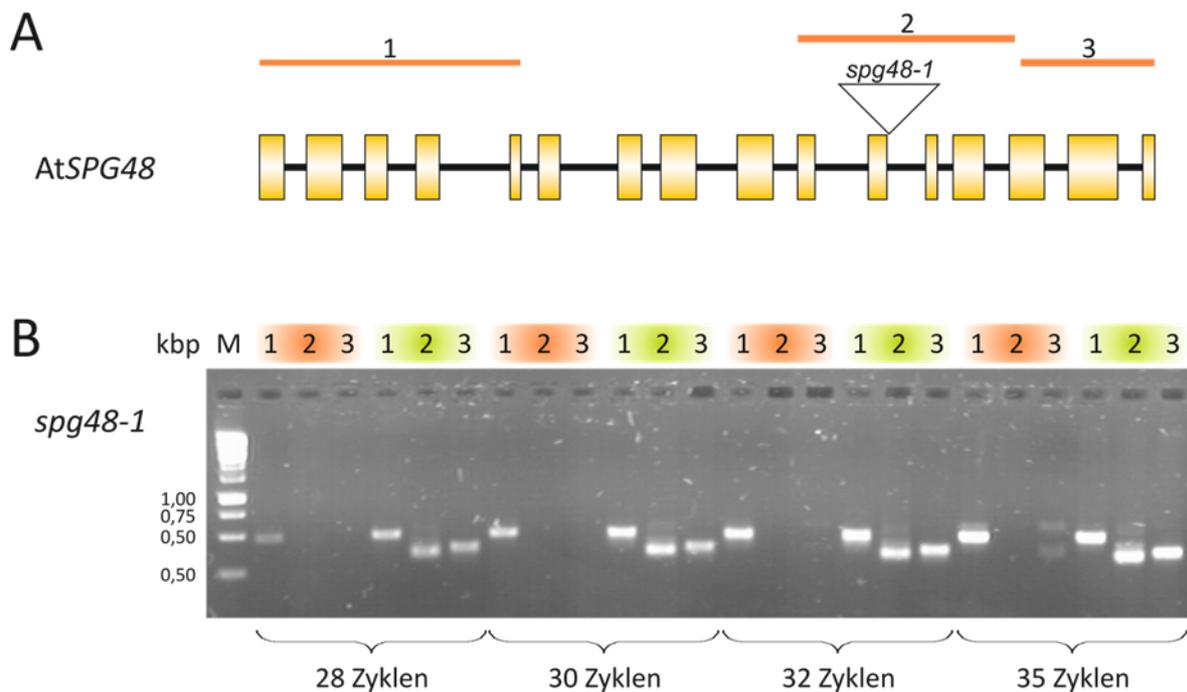


Abbildung 13: Semiquantitative Expressionsanalyse für die Mutante *spg48-1*. (A) Lage der zur semiquantitativen Expressionsanalyse amplifizierten Fragmente. Fragment 1-3 liegt jeweils vor, über und hinter der Insertion in *spg48-1* (B) Analyse für *spg48-1*: Es ist keine Expression detektierbar, die über die Insertionsstelle reicht. Vor und nach der Insertion ist eine Expression von Restfragmenten auf mRNA-Ebene detektierbar, die allerdings schwächer ist, als beim Wildtyp. Spuren, in denen die *spg48-1*-Proben geladen wurden, sind orange unterlegt beschriftet, Spuren der Wildtyp-Proben entsprechend grün (kbp = Kilobasenpaare).

3.1.3. AtSPG48 in der somatischen DNA-Reparatur

Die Analyse des menschlichen Homologs HsSPG48 ergab in einer Zelllinie, die aus einem HSP-Patienten mit einer Mutation im HsSPG48-Gen gewonnen wurden, eine Hypersensitivität gegenüber dem crosslinkenden Agens Mitomycin C und dem Doppelstrangbruch-induzierenden Agens Bleomycin (Slabicki *et al.* 2010). Zur Analyse einer Beteiligung von AtSPG48 an der somatischen DNA-Reparatur wurde die Mutanten *spg48-1* auf Hypersensitivität gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien getestet. Bleomycin induziert Einzel- und Doppelstrangbrüche (Harsch *et al.* 2000). Doppelstrangbrüche werden in somatischem Gewebe in mehrzelligen Eukaryoten, darunter auch *Arabidopsis thaliana*, vor allem über NHEJ repariert. Methylmethansulfonat (MMS) alkyliert DNA, was bei der Replikation zu Punktmutationen führen kann und die Basenexcisionreparatur aktiviert (für eine Übersicht dazu siehe Fortini und Dogliotti 2007). Mitomycin C (MMC) und Cisplatin binden an DNA und führen zur Crosslinks. Cisplatin führt hauptsächlich zu Intrastangvernetzung, bei den MMC-induzierten Schäden stellt vor allem die Interstrangvernetzung die größte Schadenswirkung dar (Eastman 1985; Palom *et al.* 2002; Muniandy *et al.* 2010). Bei der Replikation können diese über HR-vermittelte Wege repariert werden (Deans und West 2011). Hydroxyurea (HU) hemmt die Synthese von

Desoxyribonukleotiden und führt zum Replikationsarrest (Yarbro 1992; Alvino *et al.* 2007). Am Neustart der Replikation sind viele HR-Proteine beteiligt, aber auch eine Beteiligung von NHEJ-Proteinen wurde postuliert (zur Übersicht siehe Allen *et al.* 2011). Auch der Topoisomerase 1-Inhibitor Camptothecin (CPT) führt durch die Bildung von DNA-Topoisomerase 1-CPT-Addukten zu Problemen bei der Replikation und aktiviert die Wege zum Replikationsneustart (Pommier 2009). Zur Ermittlung von Hypersensitivität wurden die Mutantenlinien mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Genotoxins behandelt und das Frischgewicht im Bezug zur Wildtypkontrolle ermittelt. Es konnte keine Hypersensitivität gegenüber den getesteten Genotoxinen ermittelt werden.

Abbildung 14 zeigt die Mittelwerte aus jeweils mindestens drei biologischen Replikaten exemplarisch für Bleomycin und MMC. Die Ergebnisse für alle weiteren Genotoxine finden sich im Anhang (Tabelle 10 und Abbildungen 33 und 34).

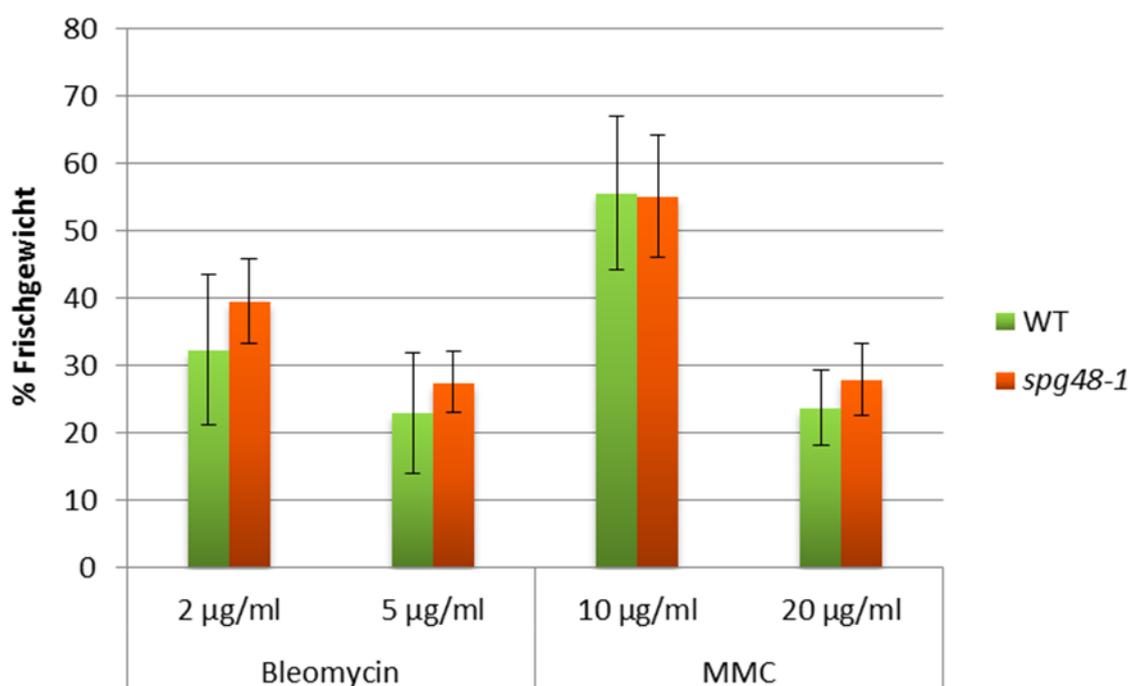


Abbildung 14: Untersuchung von *spg48-1* auf Hypersensitivität gegenüber Bleomycin und MMC. Die Mutante zeigt keine vom Wildtyp abweichende Sensitivität gegenüber den getesteten Genotoxinen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten mit Standardabweichungen (WT = Wildtyp; MMC = Mitomycin C).

3.1.4. AtSPG48 in der somatischen homologen Rekombination

Die Analyse der Raten homologer Rekombination in RNAi-Linien von HsSPG48 in HeLa-Zellen ergab eine stark verminderte Rate homologer Rekombination (Slabicki *et al.* 2010). Auch für AtSPG48 sollte eine Beteiligung an der somatischen homologen Rekombination untersucht werden.

Die Mutante *spg48-1* wurde dazu in den Rekombinationshintergrund IC9C (Molinier *et al.* 2004) eingekreuzt. Im Konstrukt IC9C, das in dieser Linie stabil in das Genom integriert ist, sind die Gensequenzen für ein C-terminales und für ein N-terminales Fragment des β -Glucuronidase-Gens (*GUS*-Gens) in direkter Orientierung hintereinander angeordnet und durch ein Resistenzgen getrennt. Dabei ist in beiden Fragmenten die Sequenzinformation für den zentralen Bereich des Proteins vorhanden, so dass über intermolekulare homologe Rekombination eine Restaurierung des *GUS*-Gens erfolgen kann (Molinier *et al.* 2004). Nach der Expression der intakten β -Glucuronidase kann deren Aktivität über eine chromogene Reaktion detektiert werden. Dabei entsteht aus der Umsetzung des Substrats X-GlcA ein blauer unlöslicher Indigofarbstoff. Das Auszählen der so entstandenen blauen Sektoren ergibt daher Aufschluss über die Rate der homologen Rekombination der verwendeten Mutante in Vergleich zum Wildtyp. Aus den Nachkommen der Einkreuzung des Rekombinationskonstruktes wurden Linien selektiert, die jeweils das Rekombinationskonstrukt und die T-DNA-Insertion homozygot tragen. Als Wildtypkontrolle wurden aus denselben Nachkommen jeweils Linien selektiert, die das Rekombinationskonstrukt homozygot, aber keine T-DNA-Insertion in *SPG48* tragen.

Mit den erhaltenen Linien wurden Rekombinationsassays in jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt und jeweils die Rate der homologen Rekombination mit und ohne Zugabe des Agens Bleomycin in Bezug auf die Wildtypkontrolle ermittelt. Im Grundzustand ohne Induktion durch Bleomycin können Rekombinationsereignisse quantifiziert werden, die spontan auftreten. Durch Bleomycin werden Doppelstrangbrüche induziert, die zur Erhaltung der Zellviabilität unabhängig vom Zellzykluszustand repariert werden müssen.

Abbildung 15 stellt die Ergebnisse für den ausgekreuzten Wildtyp und *spg48-1* im IC9C-Hintergrund mit und ohne Induktion von Doppelstrangbrüchen durch Bleomycin dar. Im Grundzustand zeigte sich in der *spg48-1*-Mutante keine vom Wildtyp abweichende Rate homologer Rekombination. Im induzierten Zustand jedoch zeigte sich eine verminderte Rate homologer Rekombination in der *spg48-1*-Mutante. Ein zweiseitiger Student-t-Test zeigte hier ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

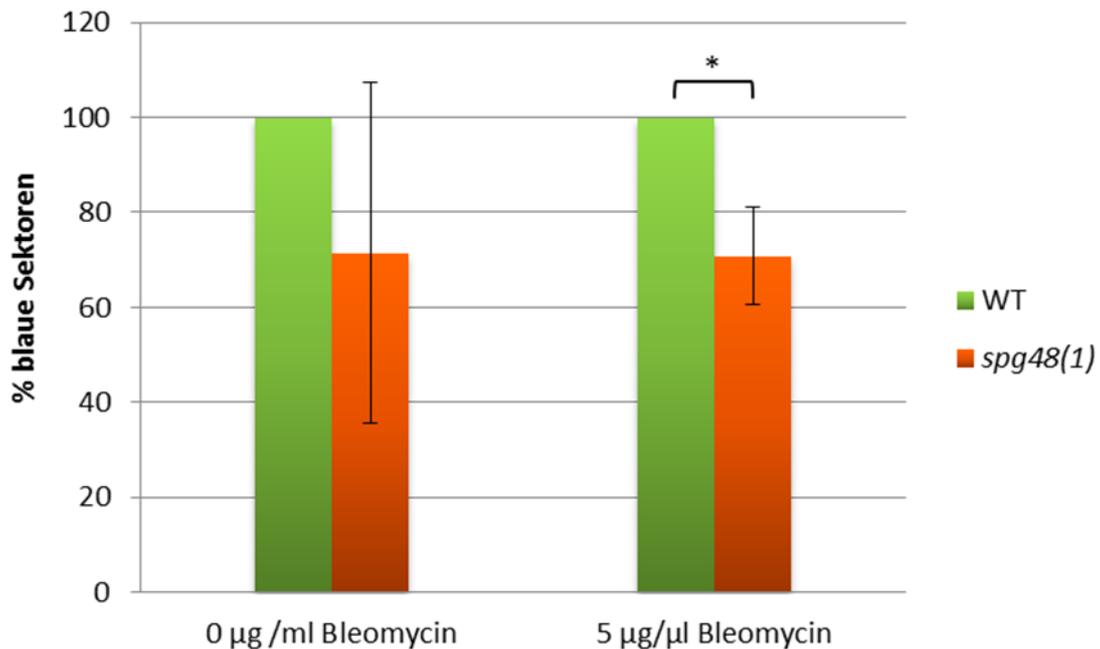


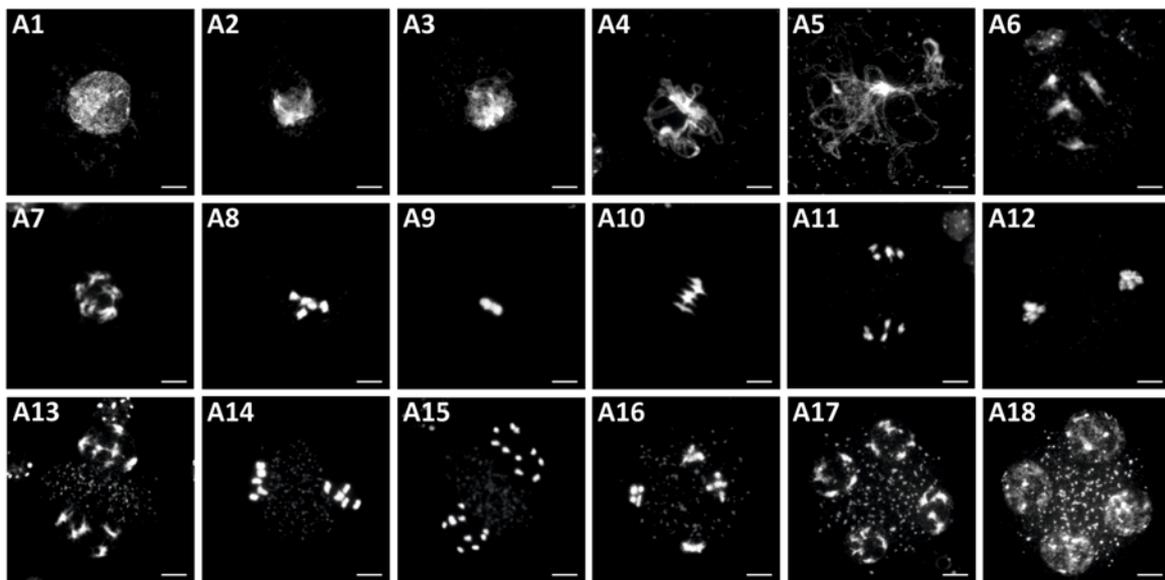
Abbildung 15: Interhomologe Rekombination in *spg48-1*. Die Anzahl an blauen Sektoren wurde in jeweils drei biologischen Replikaten bestimmt und in Bezug auf die Anzahl des Wildtyps dargestellt. Die Rate homologer Rekombination ohne Induktion (links) ist in der *spg48-1*-Mutante nicht statistisch signifikant von der des Wildtyps unterscheidbar. Nach Induktion von Doppelsträngen durch 5 µg/ml Bleomycin (rechts) ist die Rate der homologen Rekombination in der *spg48-1*-Mutante im Vergleich zur Wildtypkontrolle verringert. Dies konnte durch einen zweiseitigen Student-t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ bestätigt werden (dargestellt als *).

3.1.5. AtSPG48 in der Meiose

Zur Analyse einer möglichen Beteiligung von AtSPG48 in der Meiose wurde zunächst eine Fertilitätsanalyse durchgeführt. Dafür wurde die durchschnittliche Anzahl der Samen pro Schote in *spg48-1* und im Wildtyp ermittelt. Es konnte keine Beeinträchtigung der Fertilität ermittelt werden (siehe Anhang Abbildung 35). Zur genaueren Untersuchung wurden außerdem Chromatinpräparationen in der Meiose von Pollenmutterzellen durchgeführt. Abbildung 16 zeigt die Meiose im Wildtyp Col-0 und die Meiose in *spg48-1* im Vergleich zum Wildtyp. Ausgehend vom Präleptotän (A1) über Leptotän (A2) und Zygotän (A3) zum Pachytän (A4) bilden sich die Chromatinachsen und die Synapsis erfolgt. Diese wird im frühen Diplotän (A5) aufgelöst und eine weitere drastische Kondensation des Chromatin lässt im späten Diplotän (A6, A7) die Bivalente, verbunden über Crossover, erkennen. Die Chromosomen werden weiter kondensiert und sind ab der Diakinese (A8) nur noch punktförmig zu erkennen. In der weitergehenden Meiose I ordnen sich in der Metaphase I (A9) die Bivalenten in der Äquatorialebene an. In der Anaphase I (A10, A11) werden die homologen Chromosomen separiert und kommen in der Telophase I (A12) an den Polen zu liegen. Es erfolgt eine vorübergehende Dekondensation im Dyadenstadium (A13). Daraufhin

werden in der Meiose II wiederum über Metaphase II (A14), Anaphase II (A15) und Telophase II (A16) die Chromatiden separiert. Letztlich entstehen als Produkte der Meiose Tetraden (A17, A18) mit vier Tochterkernen, die sich nach weiteren Entwicklungsschritten zu vier Pollenkörnern entwickeln. Die Meiose in *spg48-1* (B) ist nicht vom Wildtyp unterscheidbar.

A WT



B *spg48-1*

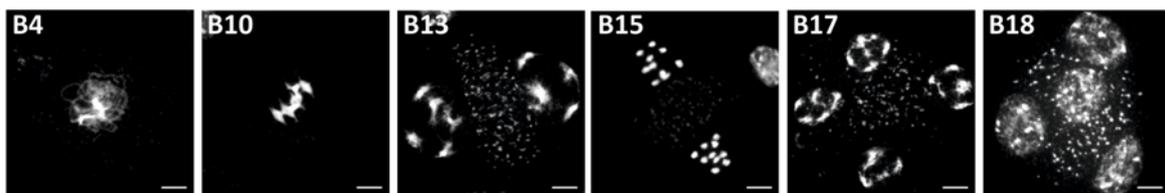


Abbildung 16: Chromatinpräparation in der Meiose von Pollenmutterzellen des Wildtyps Col-0 und der *spg48-1*-Mutante. (A1-18) Meiose im Wildtyp Col-0. Vom Präleptotän (A1) zum Leptotän (A2) bilden sich die Chromatinachsen, die im Zygotän (A3) schon teilweise synapsiert sind. Im Pachytän (A4) ist die Synapsis abgeschlossen. Im frühen Diplotän (A5) wird die Synapsis wieder aufgehoben und die Chromosomen verkürzen sich hin zum späten Diplotän (A6, A7) drastisch. Nun ist auch die Bivalentbildung erkennbar, die Crossover sind als Verbindungen erkennbar, an denen die homologen Chromosomenpaare verknüpft sind. Nach einer weiteren Verdichtung des Chromatins hin zur Diakinese (A8) ordnen sich die Bivalente in der Äquatorialebene an, die Metaphase I (A9) ist erreicht. In der Anaphase I (A10, A11) werden die Chromosomen zu den Polen gezogen, an denen sie in der Telophase I (A12) zu liegen kommen. Nach einer geringfügigen Entspiralisierung im Dyadenstadium (A13) ordnen sich die nun wieder hochverdichteten Chromosomen erneut in den Äquatorialebenen an. Ausgehend von der Metaphase II (A14) werden die Chromatiden in der Anaphase II (A15) separiert und liegen letztlich als vier Chromatidpakete in der Telophase II (A16) vor. Die Chromatiden werden nun wieder entspiralisiert und bilden das Produkt der Meiose: eine Tetrade (A17, A18). Aus einer Pollenmutterzelle entstehen so nach weiteren Entwicklungsschritten vier Pollenkörner. (B) Meiosestadien aus *spg48-1*. Exemplarisch sind Stadien für den Vergleich mit dem Wildtyp gezeigt, gleiche Nummern stehen dabei für vergleichbare Stadien. Es sind keine Unterschiede zwischen den Meiosestadien der Mutante und denen des Wildtyps erkennbar (WT = Wildtyp). Der Größenmarker entspricht 5 µm.

3.2. Gewinnung von Antikörpern gegen Proteine der meiotischen Rekombination

Mithilfe von Antikörpern können verschiedene Fragestellungen in der Charakterisierung von Proteinen und deren Einbindung in zelluläre Prozesse adressiert werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Gewinnung von Antikörpern gegen die Proteine RTEL1 und FANCM aus *Arabidopsis thaliana* in Auftrag gegeben und diese nach Erhalt im Western Blot validiert werden.

3.2.1. Gewinnung des RTEL1-N-Peptidantikörpers

Ein Alignment von AtRTEL1 (siehe Abbildung 17) mit dem nah verwandten Protein AtCHL1, welches eine Sequenzidentität von 23,2 % zu AtRTEL1 besitzt, ergab, dass im zentralen Bereich beider Proteine eine hohe Sequenzähnlichkeit besteht. Im N-terminalen Bereich ist die Ähnlichkeit wesentlich geringer, der C-Terminus von AtRTEL1 besitzt sogar keine Entsprechung im kürzeren Protein AtCHL1. Aus mehreren Vorschlägen von BioGenes für Peptide aus dem N-terminalen Bereich von AtRTEL1, gewonnen durch Analyse mit Antheprot, wurde letztlich das 14 Aminosäuren lange Peptid bestehend aus den Aminosäuren 9 bis 22 (SGSPTRRENQKRRV) ausgewählt, da dieses die geringste Sequenzähnlichkeit zu AtCHL1 aufwies. Zusätzlich zu den Aminosäuren 9 bis 22 von RTEL1 wurde das Peptid N-terminal mit einem zusätzlichen Cystein synthetisiert, das die Kopplung an das Carrier-Protein LPH ermöglichte. Die Synthese des RTEL1-N-Peptids wurde mithilfe der simultanen multiplen Peptidsynthese an einem Automaten SYRO der Firma MultiSynTec GmbH unter Verwendung der Fmoc/But-Strategie hergestellt (BioGenes, Peptid-Datenblatt). Die Reinheit des synthetisierten Peptids wurde über HPLC auf 90 % bestimmt. Nach einem Immunisierungsplan für eine Ziege, der ein 35-Tage-Protokoll mit der Entnahme von 5 ml Präimmunsersum und einer Erstimmunisierung am Tag 0 und drei weiteren Immunisierungsboosts umfasst, wurde am Tag 35 insgesamt 135 ml Serum gewonnen. Die Seren wurden zur Konservierung jeweils mit 0,02 % Thimerosal versetzt. Der Titer wurde von BioGenes mittels ELISA auf 1:100.000 bestimmt (BioGenes, Antiserum-Datenblatt). Als Titer definiert BioGenes die Verdünnungsstufe, bei der noch ein ELISA-Signal wahrgenommen werden kann (BioGenes, persönliche Kommunikation mit Frau Steffi Struwe). Nach einer weiteren Wartezeit von 7 Tagen wurde am Tag 42 nochmals 315 ml Serum gewonnen.

Aus 50 ml dieses Serums wurden spezifische Antikörper über eine antigengekoppelte Säule isoliert. Als Säulenmaterial wurde CNBr-Sepharose verwendet (BioGenes, Datenblatt der Aufreinigung). Es wurden insgesamt 8,87 mg monospezifische IgG erhalten und in 12,8 ml Tris-Glycin-Puffer ([pH 7,5]; 250 mM NaCl; 0,02% Thimerosal) gelöst. Damit ergibt sich die Konzentration des gelösten Antikörpers zu 0,69 mg/ml.

3.2.1. Gewinnung des RTEL1-C-Proteinantikörpers

Da im Genombrowser T-DNA-Express des Salk Institute Genomic Analysis Laboratory ein RAFL-Klon für AtRTEL1 vermerkt ist (RAFL07-99-A22), der C-terminal eine andere Intron-Exon-Struktur vorhersagt, als in der TAIR-Datenbank vermerkt ist, wurde cDNA aus dem Wildtyp Col-0 und mittels PCR ein C-terminales Fragment gewonnen, das die codierende Sequenz für die Aminosäuren 641 bis 1040 umfasst. Dieses wurde in den pGEM-Teasy-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenz bestätigte die Vorhersage, die aus der TAIR-Datenbank entnommen worden war. Eine Analyse von AtRTEL1 im C-terminalen Bereich zur Ermittlung potentiell antigener Fragmente der Firma Metabion bzw. Primm ergab drei Vorschläge für Fragmente im C-Terminus von AtRTEL1. Alle drei wurden von Primm in einen Expressionsvektor kloniert, exprimiert und aufgereinigt, um letztlich zur Immunisierung das geeignetste Fragment in Bezug auf Menge und Reinheit zu verwenden. Die Fragmente wurden als N-terminale His-Tag-Fusionsproteine – Sequenz: MGSDKI(H)₁₀GV – exprimiert. Letztlich wurde von Metabion zur Immunisierung ein 329 Aminosäuren langes Fragment, das die Aminosäuren 730 bis 1040 umfasst, gewählt (siehe Abbildung 17; eine Darstellung des zugehörigen Expressionsvektors findet sich im Anhang Abbildung 36). Dieses ergibt ein Proteinfragment mit einem Molekulargewicht von 36,9 kDa. Es wurden 2 Kaninchen nach einem 42-Tagesprotokoll immunisiert. Am Tag 0 wurde je 1 ml Präimmunserum gewonnen und die Erstimmunisierung durchgeführt. Nach zwei weiteren Immunisierungsboosts wurde an Tag 35 Serum entnommen und ein ELISA-Test gegen Antigen durchgeführt. Nach einem weiteren Immunisierungsboost wurde an Tag 42 das finale Serum gewonnen und damit der finale ELISA-Test durchgeführt. Das Ergebnis des finalen ELISA-Tests ist in Abbildung 18 dargestellt.

Es wurden insgesamt je 51 ml Serum von jedem Kaninchen gewonnen, das mit 0,02 % Natriumazid als Konservierungsmittel versetzt wurde (Metabion, Serumdatenblatt). Im ELISA-Test kann für beide Kaninchen ein deutlicher Immunisierungserfolg erkannt werden. Bei dem Immunserum aus Kaninchen 2 jedoch fällt die OD mit zunehmender Verdünnung deutlicher schneller und stärker ab.

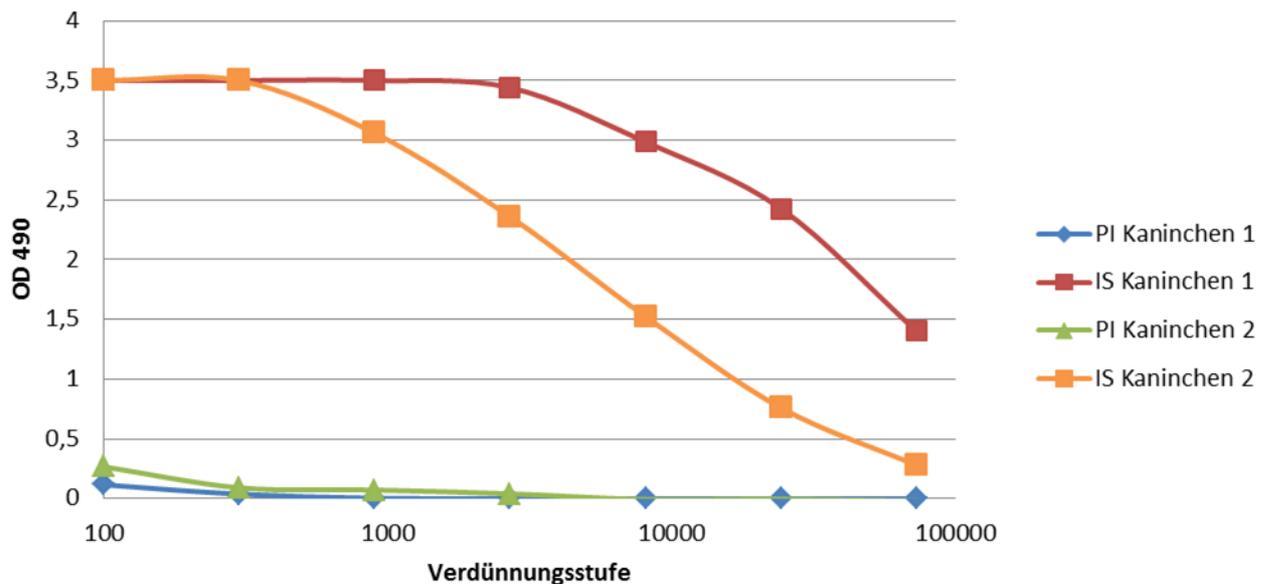


Abbildung 18: ELISA-Test für den RTEL1-C-Antikörper. Es wurden jeweils Verdünnungen im Rahmen von 1:100 bis 1:72900 für die Präimmenserum (PI) und die Immenserum (IS) beider Kaninchen durchgeführt. Die Seren beider Kaninchen ergeben bis hin zu hohen Verdünnungen im ELISA-Test eine deutlich vom Präimmenserum unterscheidbare OD, wobei die Werte für Kaninchen 2 schneller abfallen und die Werte von Kaninchen 1 länger konstant hoch bleiben (OD = optische Dichte).

3.2.2. Gewinnung des FANCM-Peptidantikörpers

Auch für den FANCM-Peptidantikörper sollte ein N-terminal gelegenes Peptid zur Immunisierung gewählt werden. Da die von BioGenes empfohlenen Peptide innerhalb der Helikasedomäne lagen, wurde eine detaillierte Analyse der Lage der einzelnen Helikasemotive von FANCM über den Sequenzvergleich mit mehreren RecQ-Helikasen erstellt. Abbildung 19 zeigt die Aminosäuresequenz von FANCM mit den eingezeichneten Helikasemotiven, die durch ein Alignment mit menschlichem FANCM (Meetei *et al.* 2005) identifiziert wurden. Von den von BioGenes vorgeschlagenen Peptiden liegt das am nächsten zum N-Terminus gelegene zwischen Helikasemotiv III und IV und damit zwischen den zwei Subdomänen der Helikase-Domäne (Bernstein *et al.* 2003). Daher wurde dieses Peptid gewählt, da so von einer eher exponierten Lage im Gesamtprotein ausgegangen werden konnte. Das FANCM-Peptid umfasst die Aminosäuren 289 bis 302 (QISTLEYRNE SDHD) und wurde wiederum aus Kopplungsgründen N-terminal mit einem zusätzlichen Cystein synthetisiert. Die Synthese des FANCM-Peptids wurde analog zur Synthese des RTEL1-N-Peptids mithilfe der simultanen multiplen Peptidsynthese an einem Automaten SYRO der Firma MultiSynTec GmbH unter Verwendung der Fmoc/But-Strategie hergestellt (BioGenes, Peptid-Datenblatt). Die Reinheit des synthetisierten Peptids wurde über HPLC auf 90 % bestimmt. Nach einem Immunisierungsplan für eine Ziege, der ein 35-Tage-Protokoll mit der Entnahme von 5 ml Präimmenserum und einer Erstimmunisierung am Tag 0 und drei

weiteren Immunisierungsboosts umfasst, wurden 5 ml Präimmunserum und 175 ml Immunserum gewonnen, der Serumtiter wurde von BioGenes per peptidspezifischem ELISA-Test zu 1:100.000 bestimmt (BioGenes, Serumdatenblatt). Zur Konservierung wurden die Seren jeweils mit 0,02% Thimerosal versetzt.

AtFANCM

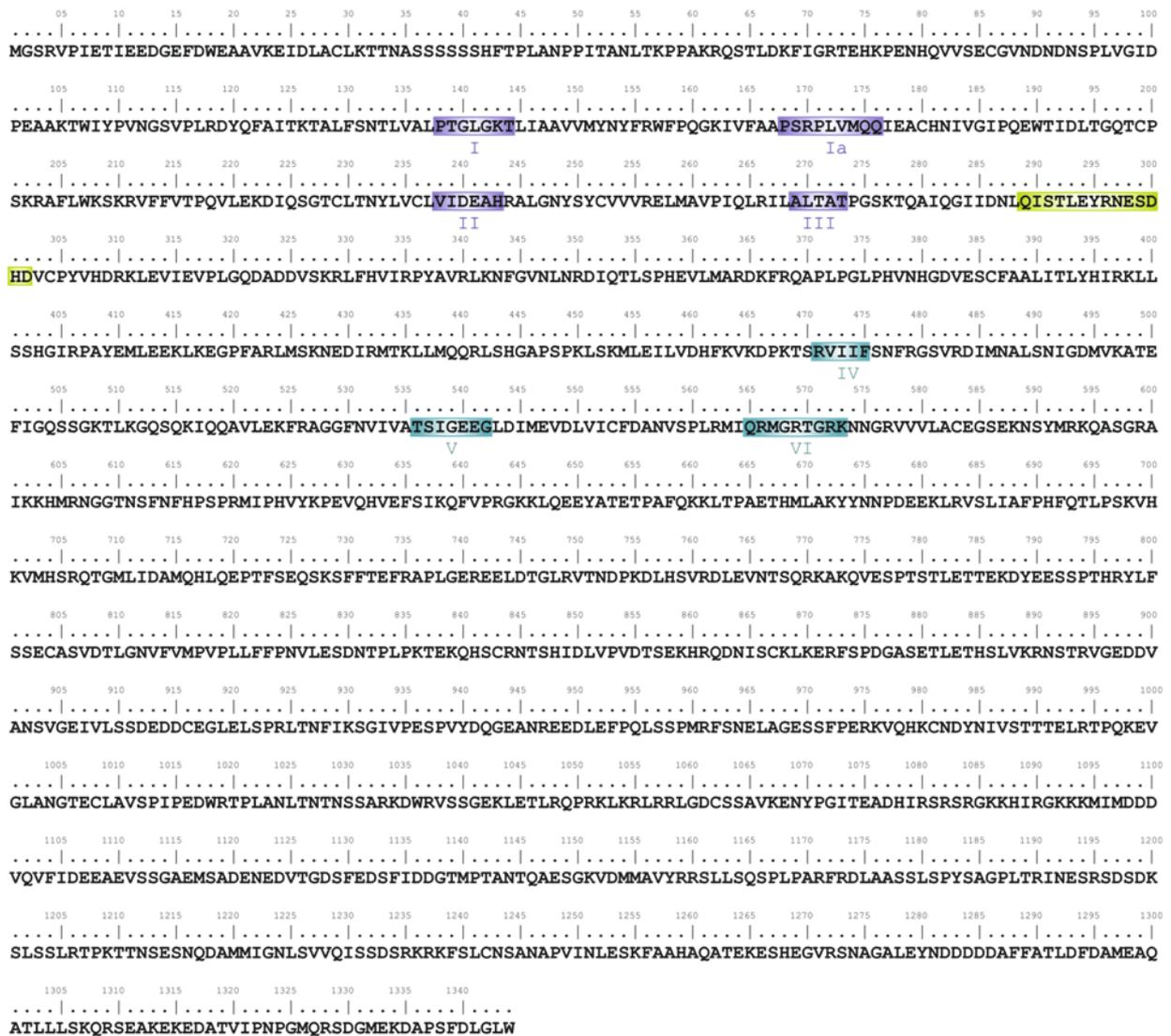


Abbildung 19: Aminosäuresequenz von AtFANCM. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von AtFANCM mit eingezeichneten Helikasemotiven. Helikasemotive der ersten Subdomäne sind in violett, Helikasemotive der zweiten Subdomäne sind blaugrün unterlegt. Das zur Immunisierung ausgewählte Peptid liegt zwischen beiden Subdomänen und ist hellgrün unterlegt.

3.2.3. Validierung der gewonnenen Antikörper über SDS-PAGE und Western Blot

Zur Validierung der gewonnenen Antikörper sollte die Erkennung der zur Immunisierung verwendeten Antigene im Western Blot getestet werden. Dazu wurden die zur Immunisierung hergestellten Peptide jeweils mit IgG-freiem BSA (Dianova) gekoppelt, um Proteine einer Masse zu schaffen, welche in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt werden können. Außerdem wurde von der Firma Metabion aufgereinigtes RTEL1-C-Proteinfragment, gelöst in einem Harnstoff-haltigem Tris-Puffer, verwendet.

Die Produkte der Kopplung BSA-FANCM und BSA-RTEL1-N bzw. das Proteinfragment RTEL1-C wurden dann über SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden jeweils 0,3 µg, 0,8 µg und 3,0 µg jedes Antigens in eine Spur eines 10%-SDS-PAGE-Gels geladen. Zur Kontrolle wurde jeweils die höchste Menge unspezifisches Antigen in eine weitere Spur geladen. Für FANCM konnte zusätzlich heterolog in *E. coli* exprimiertes Strep- und His-getagtes AtFANCM (Bauknecht, unveröffentlicht) auf das Gel aufgetragen werden. Die aufgetrennten Antigene wurden auf PVDF-Membranen geblottet und mithilfe einer chromogenen Detektion über Alkalische-Phosphatase-konjugierte Sekundärantikörper entwickelt. Als Primärantikörper wurden entweder das FANCM-Serum, das RTEL1-C-Serum oder der aufgereinigte Antikörper RTEL1-N jeweils in der Verdünnung 1:5.000 verwendet. Abbildung 20 zeigt die Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gele und entwickelten Western Blots für alle drei Antikörper.

Die Doppelbanden in Spuren, in denen quervernetztes Peptid-BSA geladen wurde, lassen auf ein Vorkommen von Peptid-gekoppelten BSA-Monomeren und BSA-Dimeren schließen. Durch den FANCM-Antikörper werden alle Verdünnungen des BSA-FANCM erkannt, jedoch kein BSA-RTEL1-N, was eine spezifische Erkennung des Peptids dokumentiert. Auch das heterolog exprimierte FANCM wurde inklusive der vorhandenen Abbaufragmente vom FANCM-Antikörper erkannt. Auch durch den RTEL1-N-Antikörper wurde spezifisch das RTEL1-N-Peptid erkannt und nicht das BSA-FANCM. Im Western Blot, der mit dem RTEL1-C-Antikörper entwickelt wurde, sind für alle Verdünnungen der RTEL1-C-Fragmentprobe verschiedene Banden unterhalb und auch oberhalb der Fragmentbande erkennbar. Viele dieser Banden sind auch im Coomassie-gefärbten Gel zu erkennen. Da für den RTEL1-C-Antikörper das von Metabion/Primm exprimierte Fragment aufgetragen wurde, erkennt der dagegen entwickelte Antikörper daher alle sich in dieser Probe befindlichen Proteine.

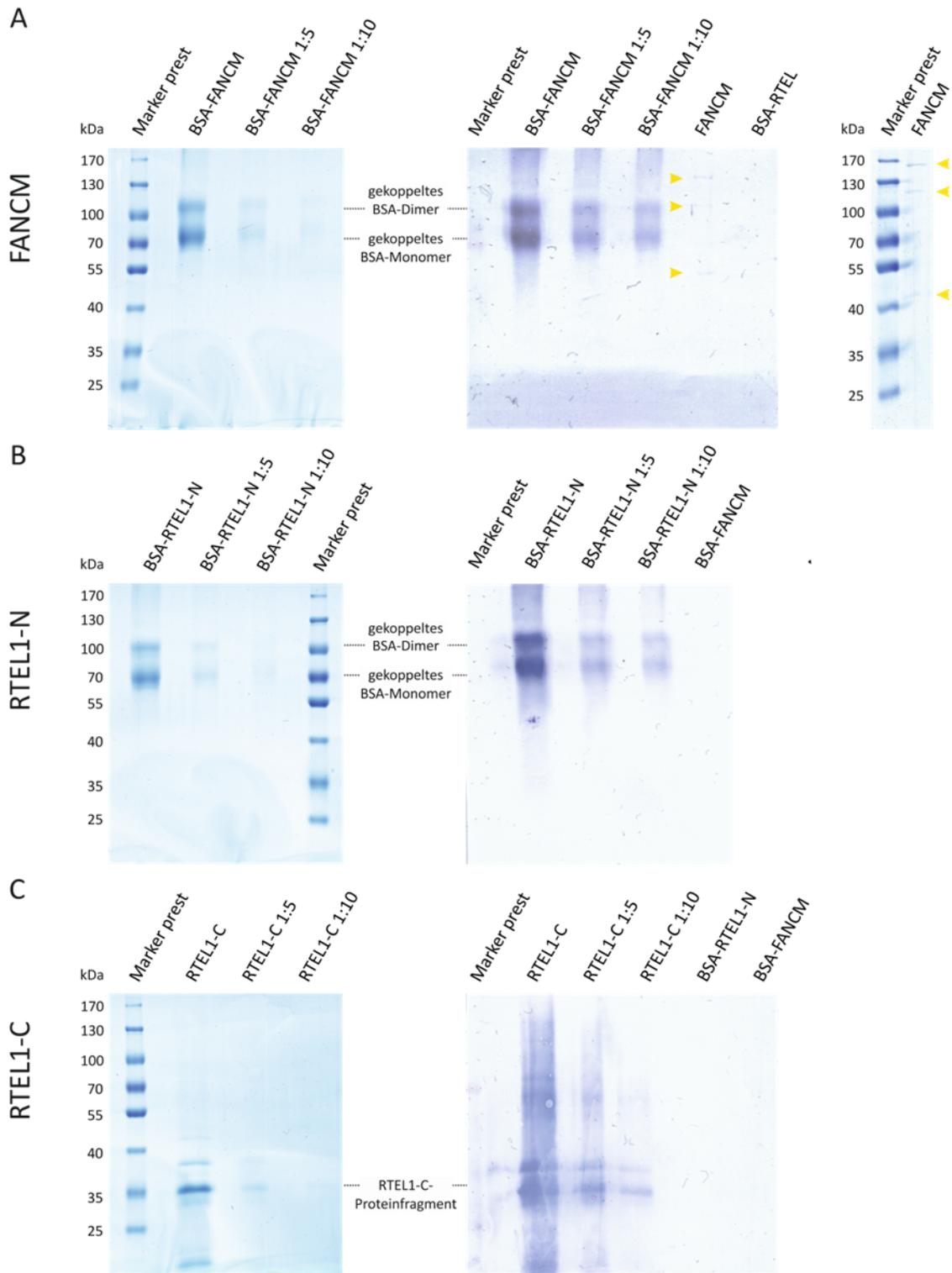


Abbildung 20: Validierung der gewonnenen Antikörper im Western Blot. Es wurden jeweils 3 µg, 0,8 µg (1:5) und 0,3 µg (1:10) peptidgekoppeltes BSA (bezeichnet als BSA-X) bzw. Proteinfragment jedes Antigen geladen. Zusätzlich wurden jeweils 3 µg Kontrollprotein(e) geladen. Die Doppelbande in den Spuren des Peptid-gekoppelten BSA resultiert aus dem Vorkommen von peptidgekoppelten BSA-Monomeren und –Dimeren. (A) FANCM-Antikörper: Der Antikörper detektiert auch die höchste Verdünnung des FANCM-peptidgekoppelten BSA klar, nicht jedoch das RTEL1-N-peptidgekoppelte BSA. Zusätzlich konnte hier eine Probe von heterolog in *E. coli* exprimiertem His-AtFANCM-Strep (Bauknecht, unveröffentlicht) untersucht werden. Der Antikörper erkennt das vollständige Protein (gelbe Pfeilspitzen) und dessen Abbaufragmente (weitere gelbe Pfeilspitzen). (B) RTEL1-N-Antikörper: Der Antikörper detektiert auch die höchste Verdünnung des RTEL1-N-peptidgekoppelten BSA klar, nicht jedoch das FANCM-peptidgekoppelte BSA. (C) RTEL1-C-Antikörper: Der RTEL1-C-Antikörper erkennt das von Metabion/Primm heterolog exprimierte RTEL1-C-Proteinfragment inklusive aller weiteren Proteine, die sich in der zur Immunisierung verwendeten RTEL1-C-Probe befinden, nicht jedoch die peptidgekoppelten BSA-Proben für FANCM und RTEL1-N (Marker prest = prestained PageRuler™).

3.3. Immunolokalisation in *Arabidopsis thaliana*

Durch die Immunolokalisation von Proteinen in der Meiose kann ein detailliertes Bild über das Fortschreiten der topologischen Veränderungen des Chromatins und der meiotischen Rekombination erhalten werden. Daher wurden Antikörper gegen verschiedene meiotische Proteine gewonnen und charakterisiert (siehe beispielsweise Armstrong *et al.* 2002; Higgins *et al.* 2004; Higgins *et al.* 2005; Sanchez-Moran *et al.* 2007).

Zur Etablierung der Methode am Lehrstuhl Botanik II sollten über die von F Christopher H Franklin (School of Biosciences, University of Birmingham) zur Verfügung gestellten Antikörper zunächst die jeweiligen Proteine im Wildtyp Col-0 lokalisiert werden.

3.3.1. Lokalisierung der Chromatinachsen mit ASY1

Die Etablierung der Methode der Immunolokalisation in Pollenmutterzellen aus *Arabidopsis thaliana* am Lehrstuhl Botanik II wurde mit dem Anti-ASY1-Antikörper durchgeführt. ASY1 markiert die sich entwickelnden Chromosomenachsen (Armstrong *et al.* 2002). Als laterales Element des synaptonemalen Komplexes stellt ASY1 eine Schnittstelle für die Proteine der Maschinerie der homologen Rekombination dar (Sanchez-Moran *et al.* 2007; Sanchez-Moran *et al.* 2008). Der ASY1-Antikörper wurde durch Immunisierung mit heterolog exprimiertem Gesamt-ASY1-Protein gewonnen (Armstrong *et al.* 2002).

Abbildung 21 zeigt die Lokalisation von ASY1 im Wildtyp Col-0 in verschiedenen Stadien der Prophase I in *Arabidopsis thaliana* Pollenmutterzellen. Ausgehend von Foci im Präleptotän der Prophase I (Abbildung 21A) sind die sich entwickelnden Chromatinachsen ab dem Leptotän (Abbildung 21B) erkennbar und werden bis hin zum Zygotän definierter (Abbildung 21C,D). Nach Ausbildung von Synapsis sind die zusammengerückten Achsen als dickere Stränge erkennbar (Abbildung 21E). Im Pachytän ist die Synapsis vollständig ausgebildet (Abbildung 21F).

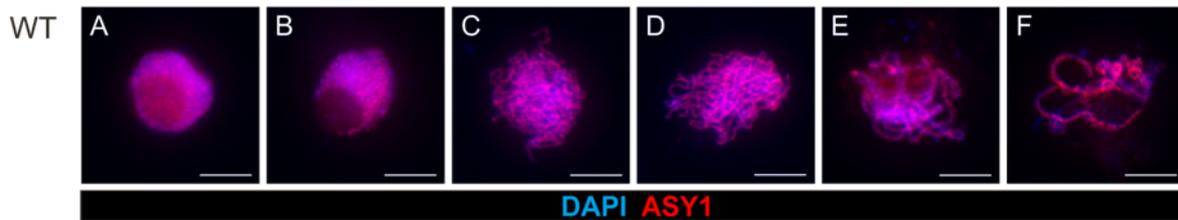


Abbildung 21: Lokalisierung der sich entwickelnden Chromatinachsen mit ASY1 im Wildtyp in verschiedenen Stadien der frühen Prophase 1. (A) Präleptotän: Das ASY1-Signal ist als zahlreiche Foci erkennbar. (B) frühes Leptotän: ASY1 markiert die sich entwickelnden Achsen. (B,C) Leptotän / Zygotän: Die Chromatinachsen sind vollständig entwickelt. (E) spätes Zygotän: Einzelne synapsierte Bereiche sind als dickere Stränge erkennbar. (F) Pachytän: Das ASY1-Signal bildet dickere Stränge, die Synapsis ist vollständig ausgebildet (WT = Wildtyp). Der Größenmarker entspricht 5 µm.

3.3.2. Visualisierung der Synapsis mit ZYP1

Die Synapsis homologer Chromosomen ist durch die Lokalisation des Proteins ZYP1 darstellbar. Das duplizierte Genpaar *AtZYP1A* und *AtZYP1B* wurde durch eine Suche nach strukturellen Homologen zu den transversalen Elementen des synaptonemalen Komplexes aus anderen Organismen, z.B. *ZIP1* aus der Bäckerhefe und *SCP1* aus dem Menschen in *Arabidopsis* identifiziert (Higgins *et al.* 2005; Osman *et al.* 2006). Der verwendete ZYP1-Antikörper ist gegen ein Fragment des Protein *AtZYP1B* gewonnen worden, erkennt aber beide Homologe, die im Weiteren als ZYP1 zusammengefasst werden sollen.

Abbildung 22 zeigt die Lokalisation von ZYP1 im Wildtyp Col-0. In der frühen Prophase I ist ZYP1 in vielen Foci lokalisiert (Abbildung 22A). Die Synapsis beginnt in einzelnen Abschnitten im Zygotän, in welchen das ZYP1-Signal als kurze Stränge erkennbar ist (Abbildung 22B,C). Die Synapsis schreitet bis zum Pachytän immer weiter fort, die vollständige Synapsis im Pachytän ist durch ein durchgehendes ZYP1-Signal auf den Chromosomenachsen erkennbar (Abbildung 22D).

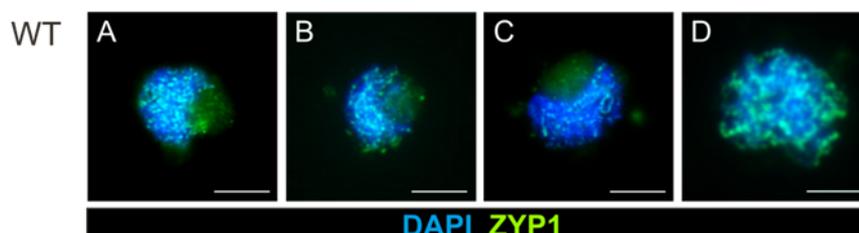


Abbildung 22: Lokalisation von ZYP1 im Wildtyp während der Ausbildung der Synapsis. (A) Leptotän: ZYP1 ist in zahlreichen Foci lokalisiert. (B, C) Zygotän: Die Synapsis beginnt und synapsierte Bereiche sind als ZYP1-Stränge erkennbar. (D) Pachytän: Die Synapsis ist vollständig ausgebildet. Das ZYP1-Signal ist als durchgehendes Signal auf den Chromosomenachsen erkennbar (WT = Wildtyp). Der Größenmarker entspricht 5 µm.

3.3.3. Darstellung früher Rekombinationsintermediate mit DMC1 und RAD51

Die Rekombinase RAD51 und sein meiosespezifisches Paralog DMC1 bilden Filamente an einzelsträngiger DNA und sorgen für die Stranginvasion als Auftakt zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen unter Verwendung homologer Sequenzen (Couteau *et al.* 1999; Li *et al.* 2004). In der Meiose agiert dabei DMC1 vor RAD51 und bevorzugt die Invasion in das homologe Chromosom, damit letztlich Crossover gebildet und Paarung homologer Chromosomen erfolgen kann (Vignard *et al.* 2007). Der RAD51-Antikörper wurde durch die Immunisierung mit heterolog-exprimiertem RAD51-Gesamtprotein gewonnen, der DMC1-Antikörper ist gegen ein Peptid aus dem N-Terminus des Proteins gerichtet (Sanchez-Moran *et al.* 2007)

Abbildung 23 zeigt die Lokalisation von DMC1 bzw. RAD51 im Wildtyp Col-0. Die Präparate zeigen Leptotän- bis Zygotänstadien. Die sich entwickelnden Chromatinachsen sind anhand des ASY1-Signals erkennbar. Ansammlungen von RAD51 bzw. DMC1 sind jeweils als zahlreiche Foci erkennbar, die sich auf den Chromosomenachsen befinden.

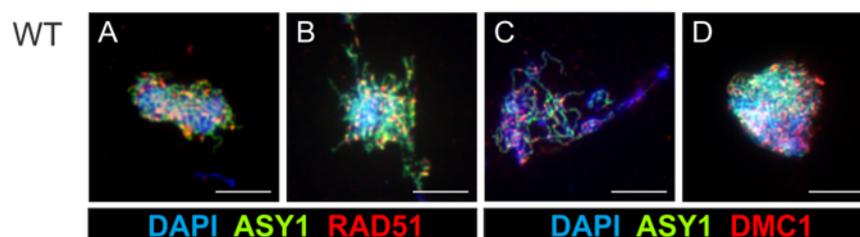


Abbildung 23: Lokalisation von RAD51 und DMC1 im Wildtyp. RAD51 (A,B) bzw. DMC1 (C,D) sind als zahlreiche Foci auf den Chromosomenachsen lokalisiert und markieren damit frühe Rekombinationsintermediate (WT = Wildtyp). Der Größenmarker entspricht 5 µm.

Zur simultanen Lokalisierung mit zwei Primärantikörpern aus derselben Spezies wurde das Protokoll dahingehend modifiziert, dass die Inkubation mit den Antikörpern konsekutiv erfolgte. Dazu wurde jeweils bei Kombination des ASY1-Antikörpers mit einem Focidetektierenden Antikörper der letztgenannte als erster Primärantikörper verwendet und dieser im Anschluss mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Fab-Fragmenten als erstem Sekundärantikörper markiert und anschließend nachfixiert. Danach wurde mit ASY1 als zweitem Primärantikörper inkubiert und dieser mit dem zweiten Sekundärantikörper detektiert. Abbildung 24 zeigt die durchgeführten Kontrollpräparationen. Es sind keine Fehldetektionen durch Fab-Fragmente als erstem Sekundärantikörper erkennbar. Zudem können keine Signale von RAD51 bzw. DMC1 in der jeweiligen Mutante detektiert werden und damit die Spezifität der verwendeten Antikörper bestätigt werden.

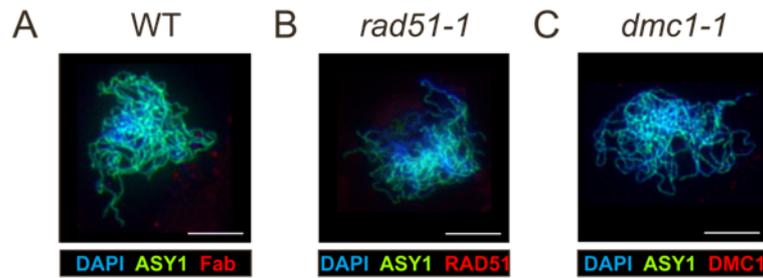


Abbildung 24: Kontrolllokalisationen für RAD51 und DMC1. (A) Es ist keine Fehldetektion durch die als ersten Sekundärantikörper verwendeten Fab-Fragmente im Wildtyp erkennbar. (B) Die Spezifität des RAD51- bzw. (C) des DMC1-Antikörpers ist durch die Abwesenheit von Signalen in der jeweiligen Mutante bestätigt (Fab = nur Fab-Fragmente, kein Primärantikörper verwendet, WT = Wildtyp). Der Größenmarker entspricht 5 µm.

3.3.4. Darstellung von Intermediaten der Crossover-Bildung mit MSH4

Die MutS-Homologe MSH4 und MSH5 agieren als Heterodimer auf dem Signalweg zur Bildung von Interferenz-insensitiven Crossovers in der meiotischen Rekombination von Arabidopsis. Sie stabilisieren frühe Rekombinationsintermediate bis hin zur Ausbildung doppelter Holliday-Junctions und fördern deren Resolution als Crossover (Higgins *et al.* 2004; Higgins *et al.* 2008b). Die *msh4*-Mutante in Arabidopsis zeigte eine stark verminderte Crossover-Frequenz und einen Verlust der Crossover-Interferenz. (Higgins *et al.* 2004). Der MSH4-Antikörper wurde durch Immunisierung mit heterolog exprimiertem Gesamtprotein gewonnen.

Abbildung 25 zeigt die Lokalisation von MSH4 im Wildtyp und in der *msh4-1*-Mutante. Es sind im Wildtyp zahlreiche Foci zu erkennen, die Mutante bestätigt die Spezifität des Antikörpers. Außerdem ist eine Sekundärantikörperkontrolle abgebildet, die zeigt, dass keine Fehlsignale durch die verwendeten Sekundärantikörper erzeugt werden.

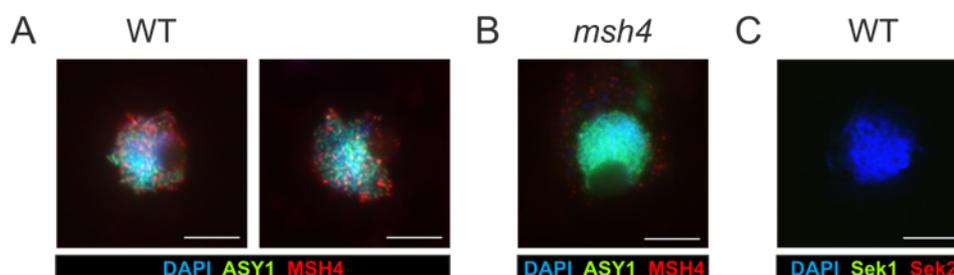


Abbildung 25: Lokalisation von MSH4 im Wildtyp und der *msh4-1*-Mutante. (A) Es sind zahlreiche Foci im WT erkennbar, die Intermediate der Crossover-Bildung (Klasse I) markieren. (B) Es sind jedoch keine Foci in der Mutante erkennbar, der Antikörper detektiert spezifisch MSH4. (C) Sekundärantikörperkontrolle: Es sind keine Signale erkennbar, die durch die Sekundärantikörper verursacht werden (Sek1 = nur Ziege-anti-Kaninchen-DyLight488 verwendet, Sek2 = nur Ziege-anti-Ratte-DyLight549 verwendet, WT = Wildtyp). Der Größenmarker entspricht 5 µm.

3.4. Immunolokalisation in Mutanten der meiotischen Rekombination in *Arabidopsis thaliana*

Durch die Lokalisierung bekannter meiotischer Schlüsselproteine in verschiedenen am Lehrstuhl etablierten Mutanten in *Arabidopsis thaliana* kann die Zugehörigkeit bzw. Einordnung der jeweiligen betroffenen Proteine in den Ablauf der meiotischen Rekombination geprüft und auch präzisiert werden. Daher werden im nachfolgenden die Ergebnisse beschrieben, welche durch Immunolokalisation in Mutanten der Gene *FANCM*, *RTEL1*, *RMI1*, *TOP3 α* , *RAD51* und in der Doppelmutante beider *BRCA2*-Gene aus *Arabidopsis* erzielt wurden.

3.4.1. Immunolokalisation in der Mutante von AtFANCM

Das Protein FANCM im Menschen bzw. dessen Homolog Mph1 in der Bäckerhefe ist an der Homologie-vermittelten Reparatur an stehengebliebenen Replikationsgabeln beteiligt und wirkt der Bildung von Crossovern entgegen (Whitby 2010). Auch in *Arabidopsis* konnte ein Homolog zu FANCM identifiziert werden (Knoll und Puchta 2011). Die *fancm-1*-Mutante zeigte neben einem somatischen HR-Phänotyp verschiedene Defekte in der Meiose von Pollenmutterzellen, darunter z.B. Chromosomenverknüpfungen in der Prophase I (Knoll 2011). Um die Rolle von FANCM in der Meiose von *Arabidopsis thaliana* näher einordnen zu können, wurden verschiedene Proteine der meiotischen Rekombination in Pollenmutterzellen von *fancm-1* immunolokalisiert.

Abbildung 26 zeigt die Lokalisation von ASY1, RAD51 und MSH4 in *fancm-1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Es kann keine Beeinträchtigung der Chromatinachsenbildung über die Lokalisation von ASY1 beobachtet werden. Auch die Bildung früher Rekombinationsintermediate, erkennbar über die Lokalisation der Rekombinase RAD51 in zahlreichen Foci ist in *fancm-1* gegenüber dem Wildtyp nicht verändert. Zudem sind zahlreiche MSH4-Foci erkennbar. Diese zeigen, dass hier frühe Rekombinationsintermediate durch MSH4 (als Bestandteil des MSH4/MSH5-Heterodimers, siehe Kapitel 1.4.3) erkannt und gebunden werden können.

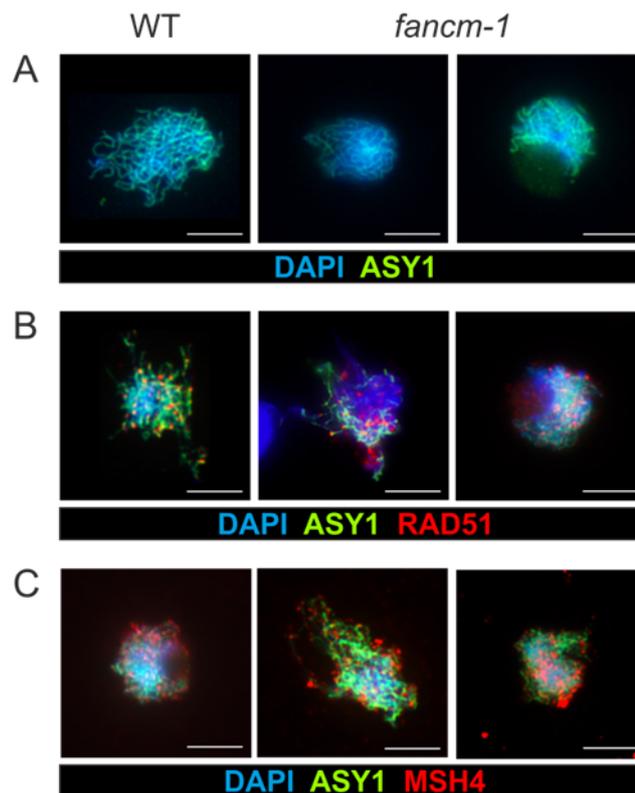


Abbildung 26: Immunolokalisation in *fancm-1*. (A) ASY1 zeigt die Ausbildung der Chromosomenachsen. Diese ist *fancm-1* nicht eingeschränkt. (B) Auch die Bildung früher Rekombinationsintermediate, hier durch zahlreiche RAD51-Foci visualisiert, ist in *fancm-1* nicht vom Wildtyp unterscheidbar. (C) Es sind zudem zahlreiche MSH4-Foci in *fancm-1* erkennbar, die zeigen, dass das MSH4/MSH5-Heterodimer frühe Rekombinationsintermediate bindet (WT = Wildtyp). Der Größenmarker entspricht 5 μ m.

3.4.2. Immunolokalisation in der Mutante von AtRTEL1

Für die Helikase RTEL1 wurden neben ihrer Funktion in der Erhaltung der Telomere auch eine Rolle in der DNA Reparatur über SDSA beschrieben, darunter für *C. elegans* auch in der meiotischen Rekombination (Uringa *et al.* 2011). Auch für das RTEL1-Homolog in *Arabidopsis thaliana* konnte eine Rolle in der somatischen Rekombination beschrieben werden (Knoll 2011). Außerdem konnten meiotische Defekte in der Mutante *rte1-1* beobachtet werden. Daher sollten in der Mutante *rte1-1* Schlüsselproteine der meiotischen Rekombination (genauer beschrieben in Kapitel 3.3) immunolokalisiert werden.

Abbildung 27 zeigt die Lokalisation von ASY1, ZYP1, RAD51 und MSH4 in der frühen Prophase von Pollenmutterzellen in *rte1-1*. Die Lokalisation der untersuchten Proteine ist nicht vom Wildtyp unterscheidbar. Damit zeigt sich über die ASY1- und ZYP1-Lokalisation, dass in *rte1-1* eine normale Chromatinachsenbildung und Synapsis erfolgt. Auch die Initiation der Rekombination und Stabilisierung von Rekombinationsintermediaten, hier gezeigt durch die Ausbildung zahlreicher RAD51- bzw. MSH4-Foci, ist nicht beeinträchtigt.

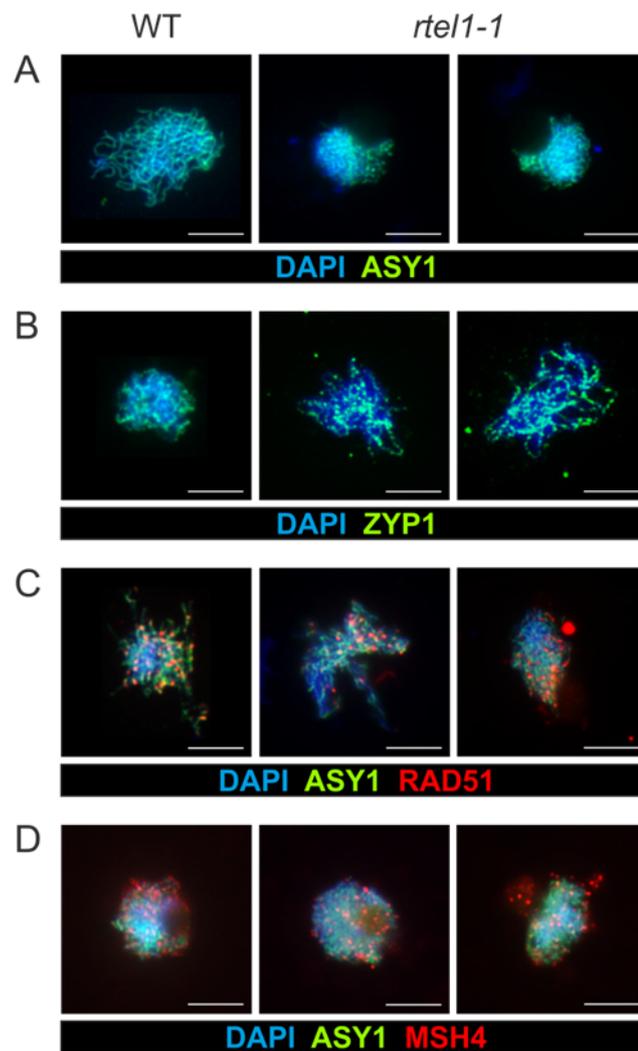


Abbildung 27: Immunolokalisation in *rtel1-1*. Die Lokalisation von (A) ASY1, (B) ZYP1, (C) RAD51 und (D) MSH4 ist in *rtel1-1* nicht beeinträchtigt. Damit finden in der *rtel1-1*-Mutante die Ausbildung von Chromatinachsen und die Synapsis wie im Wildtyp statt. Außerdem werden frühe Rekombinationsintermediate durch RAD51 gebildet und über MSH4/MSH5, hier über MSH4-Foci erkennbar, zur Stabilisation gebunden (WT = Wildtyp). Der Größenmarker entspricht 5 µm.

3.4.3. Immunolokalisation in Mutanten von AtTOP3α und AtRMI1

Der RTR-Komplex zur Dissolution doppelter Holliday-Junctions zu Non-Crossover-Produkten besteht im Menschen aus der Topoisomerase TOP3α, den Strukturproteinen RMI1 und RMI2 und der RecQ-Helikase BLM (Mankouri und Hickson 2007; Singh *et al.* 2008). Neben einer Beteiligung an der somatischen HR konnten für die Arabidopsis-Homologe von TOP3A und RMI1 auch meiotische Funktionen beschrieben werden (Hartung *et al.* 2007a; Chelysheva *et al.* 2008; Hartung *et al.* 2008). Nach schweren Chromosomenfragmentierungen und Chromosomenbrückenbildung wird die Meiose in den Pollenmutterzellen beider Mutanten letztlich nach der Meiose I abgebrochen. Über Immunolokalisation sollte daher das Fortschreiten der meiotischen Rekombination in *top3α-2* und *rmi1-1* visualisiert werden.

Abbildung 28 zeigt die Lokalisation der Chromatinstrukturproteine ASY1 und ZYP1, sowie der Rekombinasen DMC1 und RAD51 und des Stabilisator-komplexproteins MSH4 in beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Col-0.

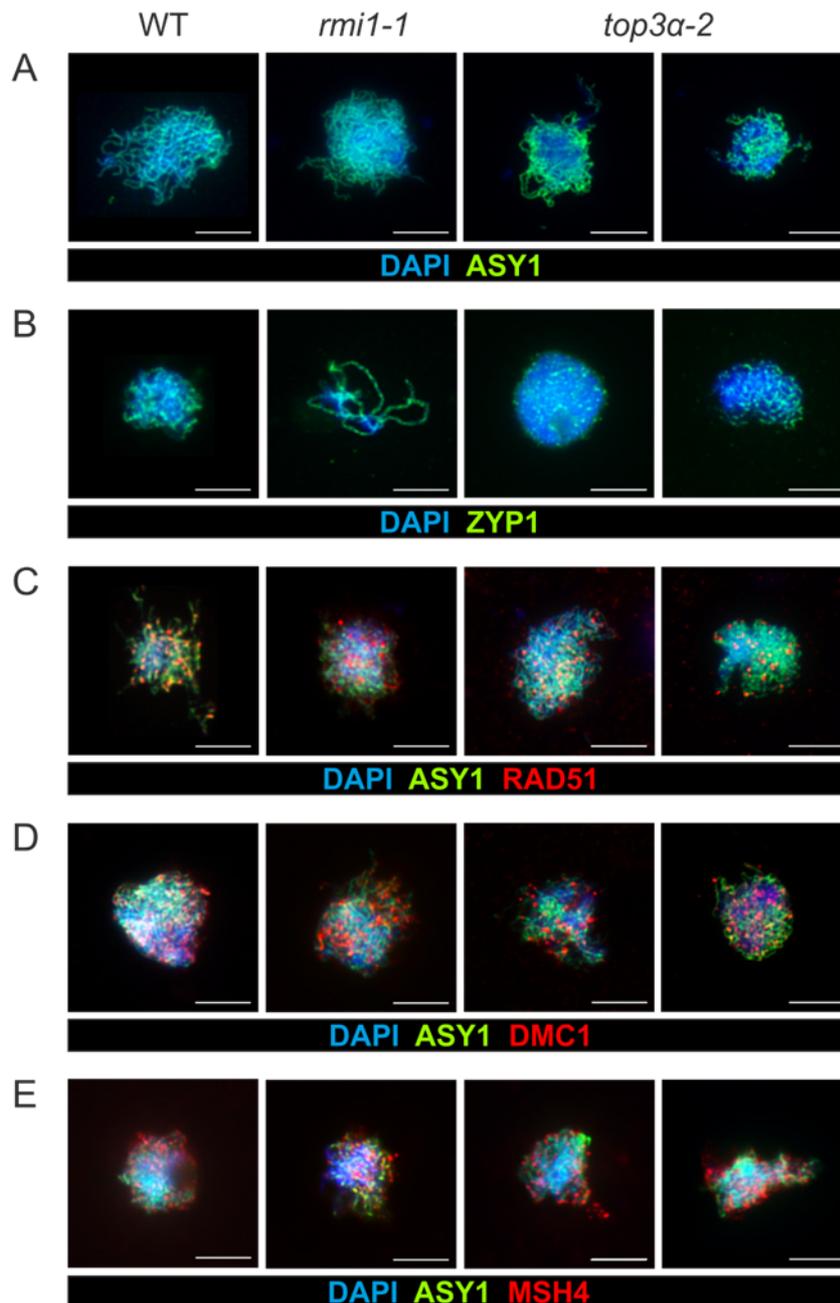


Abbildung 28: Immunolokalisation in *rmi1-1* und *top3α-2*. In Bezug auf (A) die Chromatinachsenbildung, visualisiert über ASY1, und (B) die Synapsis, hier visualisiert über ZYP1, zeigen beide Mutanten keine Beeinträchtigung im Vergleich zum Wildtyp. Auch die Initiation und Weiterführung der Rekombination ist nicht eingeschränkt, zu sehen an der Ausbildung von Foci der Rekombinasen (C) RAD51 und (D) DMC1 bzw. (E) des Stabilisator-komplexproteins MSH4 (WT = Wildtyp). Der Größenmarker entspricht 5 µm.

Die Lokalisation der untersuchten Proteine ist in beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt. Neben Chromatinachsenbildung und Synapsis, dargestellt über die ASY1- und ZYP1-Achsen, ist auch die Stranginvasion, erkennbar als DMC1- und RAD51-Foci, in *top3α-2* und *rmi1-1* nicht vom Wildtyp unterscheidbar. In beiden Mutanten sind zudem MSH4-Foci sichtbar, die Einleitung der Bildung Interferenz-sensitiver Crossover ist somit nicht durch den Ausfall von TOP3α bzw. RMI1 betroffen.

3.4.4. Immunolokalisation in Mutanten von AtRAD51 und AtBRCA2

Die eukaryotische Rekombinase RAD51 vermittelt in der somatischen und meiotischen Rekombination Homologiesuche und Einzelstranginvasion zur Ausbildung eines D-Loops (Holthausen *et al.* 2010). In der Meiose wirkt neben RAD51 dessen Paralog DMC1, welches die Invasion in das homologe Chromosom statt in das Schwesterchromatid fördert (Kagawa und Kurumizaka 2010). Die Stranginvasion wird über ein Mediatorprotein ermöglicht. In der Bäckerhefe ist dies RAD52, in Metazoen spielt RAD52 wohl aber eine eher untergeordnete Rolle und das Protein BRCA2 hat hier diese Mediatorfunktion übernommen (Holloman 2011). In Arabidopsis zeigt die *rad51-1*-Mutante schwerwiegende meiotische Defekte, wie Chromosomenfragmentierung und Chromosomenbrücken, welche letztlich zur Sterilität im homozygoten Zustand führt (Li *et al.* 2004). Durch eine lokale Duplikation entstanden in Arabidopsis zwei Homologe des *BRCA2*-Gens – *BRCA2A* und *BRCA2B* (Übersicht in Trapp *et al.* 2011). Die Doppelmutante *brca2* zeigt im doppelt homozygoten Zustand einen mit der *rad51-1*-Mutante vergleichbaren meiotischen Phänotyp (Seeliger *et al.* 2011). Ob auch in Arabidopsis BRCA2 als Mediator der RAD51- und DMC1-vermittelten homologen Rekombination dient, wurde über Immunolokalisation weiterführend untersucht.

Abbildung 29 zeigt die vergleichende Lokalisation der in Kapitel 3.3 beschriebenen Proteine im Wildtyp, der *rad51-1*-Mutante und der *brca2*-Doppelmutante. Die Ausbildung der Chromatinachsen findet in beiden untersuchten Mutanten wie im Wildtyp statt, das ASY1-Signal ist auf den Achsen zu erkennen. Allerdings ist keine Ausbildung ZYP1-markierter Synapsis in *rad51-1* und *brca2* erkennbar. Wie in *rad51-1*, so sind auch in *brca2* keine RAD51 und DMC-Foci und auch keine MSH4-Foci erkennbar. Die meiotische Rekombination ist also ab dem Zeitpunkt der Stranginvasion in beiden Mutanten drastisch beeinträchtigt.

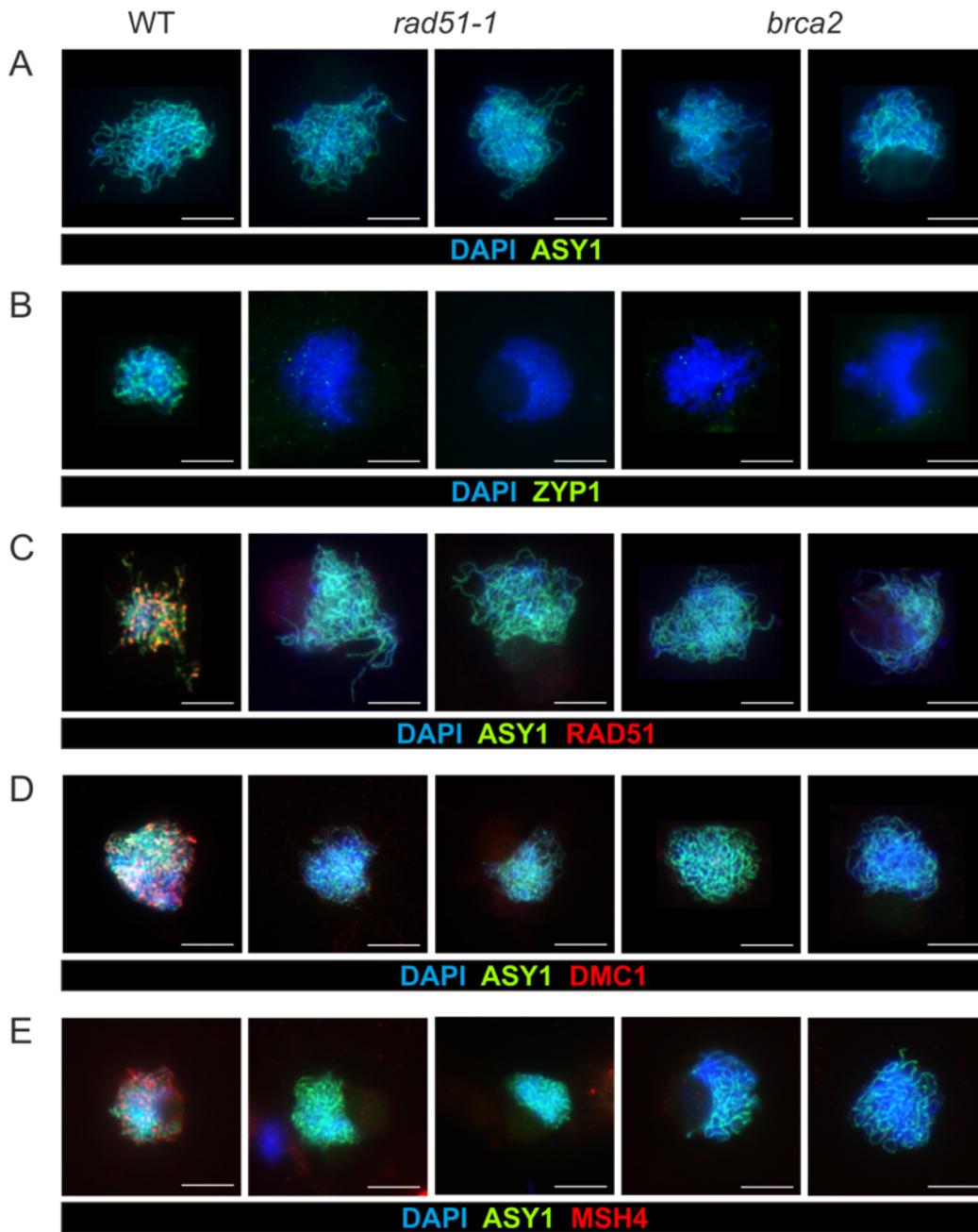


Abbildung 29: Immunolokalisation in *rad51-1* und *brca2*. (A) Die Ausbildung der Chromatinachsen, hier über die Bildung von ASY1-Strängen visualisiert, ist in beiden Mutanten nicht beeinträchtigt. (B) Beide Mutanten zeigen einen asynaptischen Phänotyp: es werden keine ZYP1-Stränge ausgebildet. Es können keine (C) RAD51- oder (D) DMC1-Foci detektiert werden. Beide Mutanten zeigen somit keine Ausbildung RAD51- oder DMC1-abhängiger früher Rekombinationsintermediate. (E) Es sind weiterführend auch keine MSH4-Foci detektierbar. Der Größenmarker entspricht 5 μm .

3.5. Meiose in *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

Die Tomate Micro-Tom hat viele Vorteile (siehe Kapitel 1.5), die sie zu einem vielversprechenden neuen Modellorganismus, auch für die Untersuchung der meiotischen homologe Rekombination machen (Campos *et al.* 2010; Carvalho *et al.* 2011). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit das Protokoll für die effiziente Chromatinpräparation als Grundlage der Meiosezytologie in Micro-Tom am Lehrstuhl Botanik II etabliert werden.

3.5.1. Chromatinpräparation in der Meiose von Micro-Tom

Die Methode der Chromatinpräparation in der Meiose von Pollenmutterzellen sollte ausgehend vom Protokoll für *Arabidopsis thaliana* (siehe Kapitel 2.7.1) etabliert werden. Dazu wurden Knospen verschiedener Größe von *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom zunächst fixiert und nach Größe sortiert. Da auch in Micro-Tom die Meiose in den Pollenmutterzellen koordiniert abläuft und mit der Größe der Knospen in Relation gesetzt werden kann (Stack und Anderson 1986), wurden zunächst Knospen verschiedener Größenordnungen einzeln präpariert, um die Größe der Knospen einzugrenzen, in denen die Meiose in den Pollenmutterzellen abläuft. Die Größenmessung erfolgte mithilfe einer Neubauer-improved Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG). Die Messung erfolgte jeweils nach Entfernung des Blütenkelchs. Im Gegensatz zum Protokoll für *Arabidopsis* konnten auch in der Chromatinpräparation die Antheren vor der mechanischen Zerkleinerung vereinzelt werden. So konnte der Anteil von meiotischen Zellen in der Präparation erhöht werden.

Abbildung 30 zeigt Stadien, die aus den Präparationen verschieden großer Knospen erhalten wurden. Während bei Knospen, die (A) ca. 2 mm groß waren, vor allem Präleptotän-Stadien zu finden waren, so konnten aus Knospen, (C) die ca. 3,5 mm groß waren, schon Pollen mikroskopiert werden. (B) Meiosestadien konnten v.a. in Knospen gefunden werden, die 2,5 mm bis 3,0 mm groß waren. Somit konnte die optimale Größe von zu präparierenden Micro-Tom-Knospen auf 2,5 bis 3,0 mm bestimmt werden.

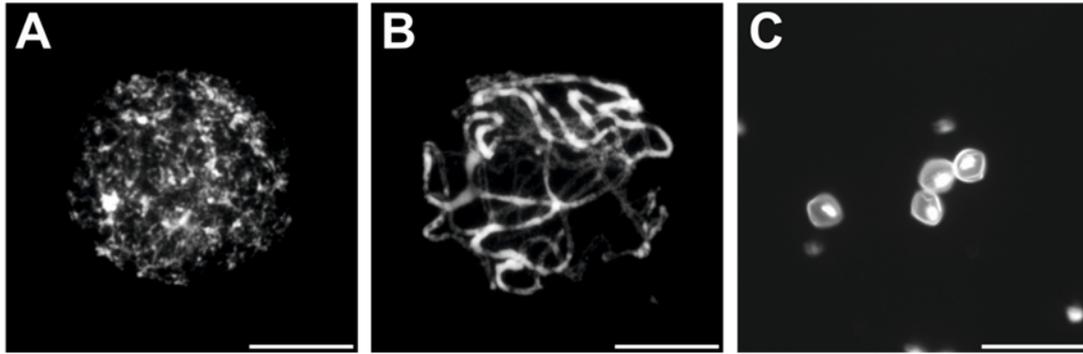


Abbildung 30: Größenbestimmung von Knospen von Micro-Tom in der Meiose. (A) Aus Knospen von ca. 2mm Größe konnten vor allem Präleptotän-Stadien präpariert werden. (B) In Knospen von 2,5 mm bis 3,0 mm Größe durchlaufen die Pollenmutterzellen die Meiose, hier exemplarisch ein spätes Pachytänstadium. (C) Knospen von ca. 3,5 mm Größe enthalten schon Pollen. Der Größenmarker entspricht 10 µm.

Dies wurde genutzt um aus Knospen der der geeigneten Größe den Ablauf der Meiose im Micro-Tom Wildtyp über Chromatinpräparation darzustellen. Abbildung 31 zeigt die Meiose Pollenmutterzellen in Micro-Tom. Ausgehend vom (A) Präleptotän kann im (B) Leptotän die Kondensation der Chromosomen und die Ausbildung der Chromatinachsen beobachtet werden. (C) Im Zygotän sind schon einzelne Bereiche synapsiert (siehe Pfeil). (D) Im Pachytän ist die Synapsis dann vollständig ausgebildet. Bei genauerer Betrachtung können die zu einem dickeren Strang zusammengelagerten einzelnen Stränge erkannt werden (siehe Pfeil). (E) Im frühen Diplotän sind die Chromosomen wieder entsynapsiert und (F) verkürzen sich zum späten Diplotän hin stark, so dass sie jetzt als einzelne Einheiten erkennbar sind. In diesem Stadium sind auch Crossover als Chiasmata zwischen Bivalenten sichtbar (siehe Pfeil). Nach einer weiteren Verkürzung der Chromosomen hin zur (G) Diakinese ordnen sich die Chromosomen dann in (H) der Metaphase I in der Äquatorialebene an und werden in (I) der Anaphase I zu den entgegengesetzten Polen gezogen. (J) In der Telophase I sind dann die Homologen jeweils auf die Zellpole verteilt und ordnen sich wiederum in der Äquatorialebene an (Metaphase II). (K) In der Anaphase II werden nun die Chromatiden zu den Zellpolen gezogen, so dass in (L) der Telophase II insgesamt vier Chromatingruppen zu erkennen sind. (M,N) Die Meiose endet in einer Tetrade und das Chromatin dekondensiert wiederum. (O) Die Produkte der Meiose sind vier Pollen, die aus einer Pollenmutterzelle entstanden sind.

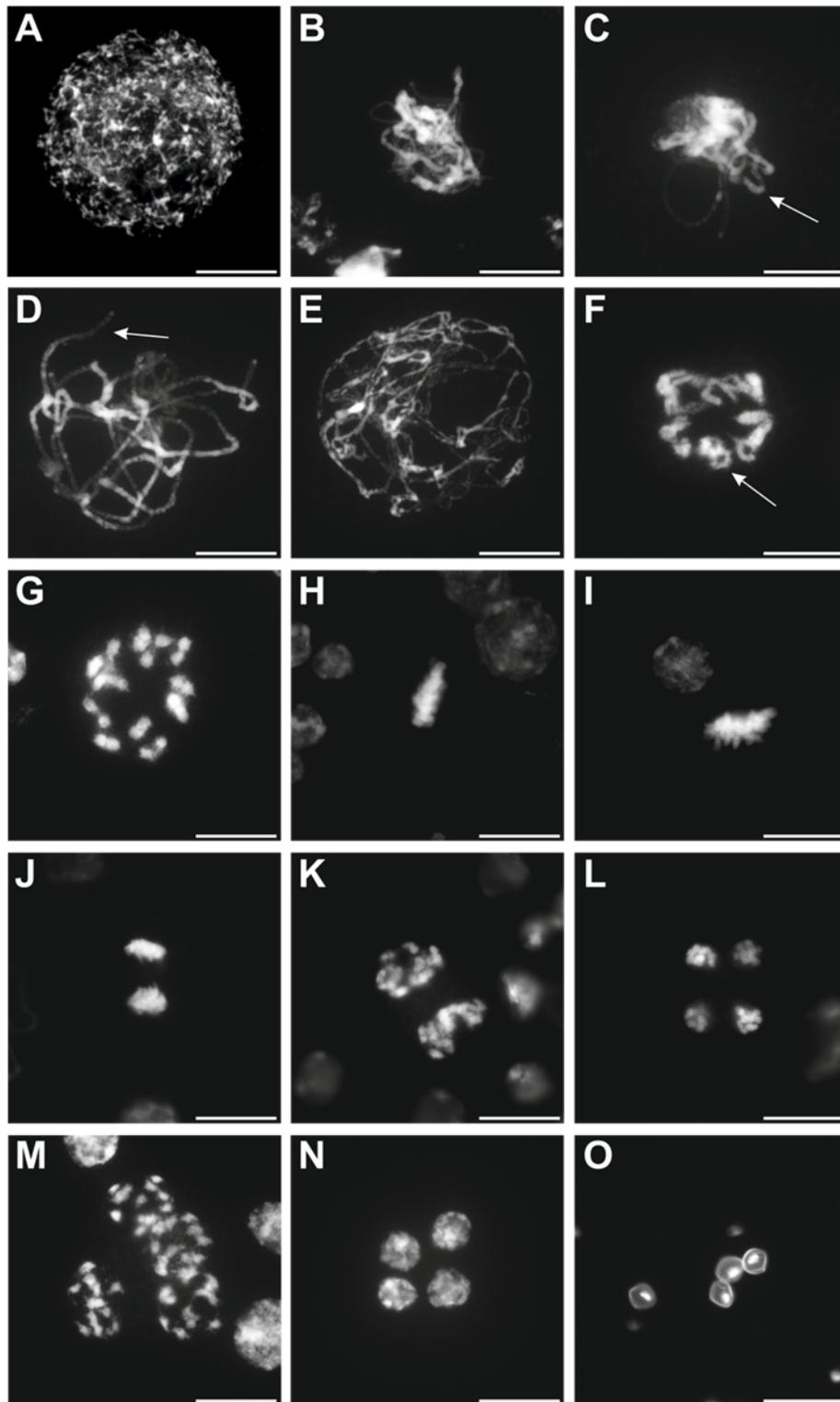


Abbildung 31: Meiose in *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. (A) Präleptotän: Die Kondensation der Chromosomen beginnt. (B) Leptotän: Die Chromatinachsen werden erkennbar. (C) Zygotän: Die Synapsis beginnt sich auszubilden (siehe Pfeil). (D) Pachytän: Die Synapsis ist vollständig ausgebildet, synapsierte Einzelstränge sind erkennbar (siehe Pfeil). (E) Frühes Diplotän: Die Chromosomen sind wieder entsynapsiert. (F) Spätes Diplotän: Die Bivalenten mit Chiasmata (siehe Pfeil) sind erkennbar. (G) Diakinese: Nach weiterer Verkürzung der Chromosomen sind diese als Chromatinpunkte zu sehen. (H) Die Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an. (I) Frühe Anaphase I: Die Chromosomen werden zu den Zellpolen gezogen. (J) Telophase I: Die Chromosomen sind auf die Pole verteilt und ordnen sich anschließend wieder in der Äquatorialebene an (Metaphase II). (K): Anaphase II: Die Chromatiden werden zu den Polen gezogen. (L) Telophase II: Es sind vier Chromatingruppen an den Polen zu erkennen. (M, N) Tetrade: Das Chromatin beginnt wieder zu decondensieren. Es sind vier Tochterkerne entstanden. (O) Pollen: Das Produkt der Meiose einer Pollenmutterzelle sind vier Pollen. Der Größenmarker entspricht 10 μm .

4. Diskussion

4.1. Das SPG48-Homolog in *Arabidopsis thaliana*

In einer genomweiten Suche nach rekombinationsassoziierten Proteinen wurde das bis dato nicht näher beschriebene Protein SPG48 im Menschen identifiziert (Slabicki *et al.* 2010). Der Ausfall von SPG48 führte zu einer Reduktion der somatischen Rekombination und einer Hypersensitivität gegenüber dem crosslinkenden Agens MMC. Über eine Interaktionsstudie konnte SPG48 mit der erblichen spastischen Spinalparalyse (HSP), einer neurodegenerativen Erkrankung, in Verbindung gebracht werden. Tatsächlich wurde in Zellen von HSP-Patienten eine Mutation in *SPG48* gefunden werden. Über kombinierte Primär- und Sekundärstrukturanalyse konnten Helikasemotive in HsSPG48 beschrieben werden und es wurde eine Helikasefunktion postuliert.

Die Verbindung zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und Defekten in der DNA-Reparatur wurde schon relativ früh gezogen (Cleaver 1968; Übersicht in Rass *et al.* 2007; Jeppesen *et al.* 2011). Patienten, die an Xeroderma Pigmentosum leiden, zeigen sowohl eine hohe Anfälligkeit für Krebserkrankungen, insbesondere Hautkrebs, als auch neurologische Degeneration. Die meisten Formen dieser Krankheit werden durch Mutationen in Proteinen ausgelöst, die an der Nukleotidexcisionsreparatur beteiligt sind (Übersicht in Feller *et al.* 2010; Pascucci *et al.* 2011). Daher erklärt sich auch die hohe Anfälligkeit für UV-induzierte Schäden. Dass gerade auch die neuronalen Zellen betroffen sind, kann damit erklärt werden, dass die hohe Stoffwechselrate in den Neuronen zu einem vermehrten Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies führt, welche die DNA schädigen. Werden diese nicht repariert, so führt deren Akkumulation zum Absterben der neuronalen Zellen und damit letztlich zu neurodegenerativen Symptomen (Rass *et al.* 2007). Auch der Ausfall von Proteinen, die an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind, kann mit neurodegenerativen

Erkrankungen assoziiert werden. Beispielweise führen Mutationen im menschlichen ATM-Gen zur Ataxia telangiectasia (AT; Lavin und Shiloh 1997; Shiloh 1997). ATM ist eine Signalkinase, welche die zelluläre Antwort auf Doppelstrangbrüche auslöst und ist daher wichtig für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität (Shiloh 2003). Außerdem ist ATM an der Reifung von Immunzellen durch programmierte Genreorganisation beteiligt (Xu *et al.* 1996; Reina-San-Martin *et al.* 2004). Zu den Symptomen der AT zählen auch das Auftreten von Krebs, vor allem von Lymphomen und Leukämie, und immunologische Störungen. Auch für das Brustkrebsprotein BRCA2, welches in Vertebraten als Mediator der Stranginvasion zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen über homologe Rekombination fungiert, konnte durch einen gewebsspezifischen Knockout in Mäusen eine wichtige Rolle bei der Neuronalentwicklung postuliert werden (Frappart *et al.* 2007).

In dieser Arbeit konnte auch in Arabidopsis ein Homolog zu SPG48 identifiziert werden. Ein Stammbaum, der aus SPG48-Homologen verschiedener Taxa erstellt wurde, spiegelte die evolutionären Verhältnisse treffend wider. Über einen Sequenzvergleich zwischen verschiedenen SPG48-Homologen aus dem Tier- und Pflanzenreich konnte auch für das Arabidopsis-Homolog eine putative Helikasedomäne identifiziert werden. Es kann also postuliert werden, dass SPG48 auch in Pflanzen eine Helikasefunktion ausüben könnte.

Zur weiteren Untersuchung von SPG48 in Arabidopsis wurde eine T-DNA-Insertionsmutante etabliert. Es konnte durch semiquantitative Expressionsanalyse bestätigt werden, dass die Insertion in Exon 11 tatsächlich zu einer Unterbrechung des offenen Leserasters von SPG48 führt und damit kein vollständiges SPG48 exprimiert werden kann. Da die Insertion allerdings relativ weit hinten im Gen liegt und eine Expression des vorderen Teilfragments auf mRNA-Ebene beobachtet werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass *spg48-1* keine vollständige Nullmutante ist. Setzt man die Insertion in Relation zur beschriebenen putativen Helikasedomäne, so unterbricht sie diese zwischen den Helikasemotiven IV und V. Ob ein Restfragment Teilfunktionen von SPG48 in *spg48-1* aufrechterhalten kann, muss durch die Verwendung einer weiteren Mutante geklärt werden. Es wurde eine zweite Mutante isoliert, deren Untersuchung aber nicht im Rahmen dieser Arbeit abgeschlossen werden konnte.

Die Untersuchung von *spg48-1* auf eine Hypersensitivität gegenüber Genotoxinen ergab keine übermäßige Beeinträchtigung des Wachstums der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Es wurden dazu das Doppelstrangbruch-induzierende Agens Bleomycin, die Crosslinker MMC und Cisplatin, das methylierende Agens MMS und die Replikationshemmer HU und CPT verwendet. Obwohl keine essentielle Funktion von SPG48 in der Reparatur dieser Schäden gezeigt werden konnte, so ist eine Beteiligung nicht auszuschließen, da aufgrund redundanter Funktionen ein Ausfall von SPG48 durch andere Proteine kompensiert werden könnte. Da Doppelstrangbrüche in somatischen Zellen in Arabidopsis hauptsächlich über NHEJ repariert werden, zeigen Mutanten von HR-Proteinen zudem nicht unbedingt eine Hypersensitivität gegenüber Doppelstrangbruch-induzierende Agenzien (Puchta 2005).

Eine Untersuchung der Beteiligung von AtSPG48 über das Rekombinationskonstrukt IC9C (Molinier *et al.* 2004), über welches interhomologe Rekombination detektiert werden kann, ergab eine signifikante Erniedrigung der Rate nach Induktion von Doppelstrangbrüchen durch Bleomycin. Damit konnte gezeigt werden, dass SPG48 eine prorekombinogene Rolle in der Doppelstrangbruchreparatur über homologe Rekombination in Arabidopsis ausübt. Als putative Helikase könnte SPG48 dabei z.B. in der Erleichterung der Resektion zur Generierung der invasiven Überhänge oder aber auch in der Stabilisierung von Rekombinationsintermediaten durch Erweiterung der D-Loop-Struktur eine Rolle einnehmen, wie sie für andere an der homologen Rekombination beteiligte Helikasen postuliert werden (Übersicht in Knoll und Puchta 2011). Um die Rolle von AtSPG48 in der homologen Rekombination zu präzisieren, sollte aufbauend auf die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eine Analyse von Doppelmutanten mit bekannten Faktoren der somatischen Rekombination in Arabidopsis, wie RECQ4A, MUS81 und RAD5A (Hartung *et al.* 2006; Hartung *et al.* 2007a; Chen *et al.* 2008; Mannuss *et al.* 2010; Knoll und Puchta 2011) durchgeführt werden. Eine Induktion der somatischen HR mit dem crosslinkenden Agens Cisplatin könnte zudem eine Beteiligung von SPG48 an der replikationsassoziierten HR definieren, da diese dadurch spezifisch angeregt wird (Knoll 2011). So könnten auch geringfügige Defekte quantifizierbar gemacht werden, die im Rahmen dieser Arbeit ohne Induktion replikationsassoziiertter HR nicht in statistischer Signifikanz beobachtet werden konnten.

Für SPG48 in Arabidopsis konnte innerhalb dieser Arbeit keine essentielle meiotische Funktion beschrieben werden. Allerdings kann dadurch eine Beteiligung in der Meiose von *Arabidopsis thaliana* nicht ausgeschlossen werden und dies sollte daher über die Untersuchung von Doppelmutanten mit bekannten meiotischen Faktoren überprüft werden.

Die Identifizierung und erste Charakterisierung von SPG48 in *Arabidopsis thaliana* führte zur Entdeckung einer weiteren putativen Helikase, die eine wichtige Rolle in der somatischen homologen Rekombination spielt und erweitert damit den Kanon der HR Proteine in *Arabidopsis thaliana*. Mit dieser Arbeit wurde die Grundlage für weitere Untersuchungen gelegt, die letztlich zur Entwicklung eines Gesamtbildes der Funktionen von SPG48 und der Beziehung dieses Proteins zu bekannten und bis dato unbekanntem HR-Faktoren führen können.

4.2. Gewinnung von Antikörpern gegen Proteine der meiotischen Rekombination

In der vorliegenden Arbeit sollten polyklonale Antikörper gegen die Proteine RTEL1 und FANCM aus *Arabidopsis thaliana* gewonnen werden. Als Antigene zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern können prinzipiell Peptide von ca. 15 – 20 Aminosäuren Länge oder Proteinfragmente bis hin zum Gesamtprotein verwendet werden. Die Vorteile von Antipeptidantikörpern bestehen in der Möglichkeit, das zu verwendende Peptid in hoher Reinheit und Ausbeute maschinell synthetisieren zu lassen. Dieses wird dann an ein Trägerprotein hoher Masse gekoppelt, um damit die entsprechenden Tiere zu immunisieren. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass ein Peptid aufgrund seiner geringen Länge nur wenige Epitope aufweisen kann. Dies wird dadurch zu kompensieren versucht, dass über spezielle Software, z.B. Antheprot, siehe Kapitel 2.4.2, geeignete Peptide zur Immunisierung ausgewählt werden. Verwendet man zur Immunisierung Proteinfragmente bzw. sogar Gesamtproteine, so kann man von einer Vielzahl an Epitopen ausgehen, von denen zumindest eines hochantigen wirken sollte. Dies ist ein klarer Vorteil bei der Gewinnung von Antiproteinantikörpern. Der Nachteil hierbei ist, dass durch Sequenzredundanz verwandter Proteine Antikörper gewonnen werden können, die eine Kreuzreaktion mit diesen Proteinen zeigen. Daher müssen bei der Auswahl eines zur Immunisierung geeigneten Proteinbereichs Sequenzähnlichkeiten zwischen verwandten Proteinen beachtet werden. Bei der Auswahl des Tieres, in dem der Antikörper gewonnen werden soll, müssen die Unterschiede in den Protokollen und die unterschiedlichen Serumausbeuten in Betracht gezogen werden. Das gewonnene Serum kann zusätzlich aufgereinigt werden. Die Isolierung spezifischer IgGs über Affinitätschromatographie kann hier eine Verringerung des Hintergrundrauschens unspezifischer Detektion des Sekundärantikörpers bewirken, da dabei alle vorhandenen Immunglobuline aus natürlichen Immunreaktionen des Tieres und sämtliche anderen Proteinbestandteile des Serums abgetrennt werden.

Es sollten zwei Antikörper gegen das Protein RTEL1 aus *Arabidopsis* gewonnen werden, jeweils ein Antipeptid- und ein Antiproteinantikörper. Da die Sequenzähnlichkeit zum nahe verwandten Protein AtCHL1 in beiden Termini am geringsten ist, wurden diese als antigene Bereiche in Betracht gezogen. Für den RTEL1-N-Antikörper wurde die Peptidsequenz im N-Terminus aus den Vorschlägen der Firma BioGenes ausgewählt, die am nächsten zum Start-Methionin liegt. Dieses hat die geringste Ähnlichkeit zum entsprechenden Bereich in AtCHL1. Zur Immunisierung wurde als Organismus Ziege gewählt, da diese ein verhältnismäßig kurzes Immunisierungsprotokoll von nur 35 Tagen und eine sehr hohe Menge an gewinnbarem Serumvolumen von über 100 ml aufweist. Die Antikörpergewinnung z.B. in Ratte dauert 91 Tage und erbringt ein Serumvolumen von nur 10 – 15 ml pro Tier (BioGenes, persönliche Kommunikation). Da in Vorversuchen ein relativ hohes Hintergrundrauschen beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt), wurde nach der Gewinnung

des Serums eine spezifische Affinitätsaufreinigung bei BioGenes in Auftrag gegeben. Letztlich wurden so fast 9 mg aufgereinigter RTEL1-N-Antikörper erhalten.

Da im C-Terminus von AtRTEL1 ein relativ langer Bereich mit wenig Sequenzähnlichkeit zu AtCHL1 vorhanden ist (Abbildung 17) konnte ein Proteinfragment in diesem Bereich für die Gewinnung eines Antiproteinantikörpers genutzt werden. Dies wurde bei der Firma Metabion in Auftrag gegeben, die ein Proteinfragment der letzten 329 Aminosäuren des Proteins mit N-terminalem His-Tag exprimieren ließ und dies zur Immunisierung zweier Kaninchen nutzte. Proteine, die einen His-Tag tragen, können auch unter denaturierenden Bedingungen über Affinitätschromatographie an immobilisierte Metallionen (IMAC) aufgereinigt werden (Block *et al.* 2011). Dies ermöglicht die Extraktion von rekombinanten Proteinen nach heterologer Expression in *E. coli* aus sogenannten *Inclusion Bodies*. In *Inclusion Bodies* werden in *E. coli* fehlgefaltete bzw. agglomerierte Proteine abgelegt, die bei der heterologen Überexpression gebildet werden (Ventura und Villaverde 2006). Die selektive Abtrennung intakter Inclusion Bodies von löslichen Proteinen und Zelltrümmern beim Aufschluss der *E. coli*-Zellen erzielt einen starken Vorreinigungseffekt, der die Aufreinigung heterolog exprimierter Proteine immens verbessern kann (Cabrita und Bottomley 2004). Eine genaue Aussage seitens der Firma Metabion über das Aufreinigungsprotokoll für das RTEL1-C-Fragment konnte aus dem Grund der Wahrung von Betriebsgeheimnissen leider nicht erhalten werden (Metabion, persönliche Kommunikation). Allerdings wurde eine Probe des aufgereinigten Proteins gelöst in 4 M Harnstoff erhalten, was stark auf eine Nutzung der beschriebenen Methode hinweist. Der ELISA-Test für die erhaltenen Seren zeigt eine positive Reaktion der Seren beider Kaninchen, wobei das aus Kaninchen 1 erhaltene Serum bei höheren Verdünnungen bessere OD-Werte zeigt, was für eine höhere Konzentration oder Affinität der enthaltenen Antikörper spricht. Insgesamt können die Seren beider Kaninchen in Untersuchungen eingesetzt werden, wobei zunächst das Serum von Kaninchen 1 zu bevorzugen ist.

Für das Protein FANCM aus Arabidopsis sollte ein Antikörper gewonnen werden, der gegen ein Peptid aus dem N-terminalen Bereich des Proteins gerichtet ist. Da die von der beauftragten Firma BioGenes vorgeschlagenen Peptide innerhalb der Helikasedomäne lagen, wurde deren Lage in Bezug zu den Helikasemotiven detaillierter bestimmt (siehe Abbildung 19). Letztlich wurde das Peptid gewählt, das zwischen den Helikasemotiven III und IV liegt, da hier die Grenze der beiden Helikasesubdomänen liegt und diese in einer nach außen gerichteten Schleife beschrieben wurde (Bernstein *et al.* 2003). Das macht eine exponierte Lage der Aminosäuren des gewählten Peptids im Gesamtprotein FANCM sehr wahrscheinlich und damit sehr geeignet als Antigen. Die Antikörperproduktion erfolgte analog zu der des RTEL1-N-Antikörpers.

Abschließend sollten die erhaltenen Seren bzw. Antikörper im Western Blot gegen die zur Immunisierung verwendeten Antigene validiert werden, um eine erste Aussage über die Affinität der Antikörper treffen zu können. Dazu wurden jeweils eine geringe, eine mittlere und eine hohe Menge an Antigen auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und geblottet.

Außerdem wurden jeweils hohe Mengen unspezifischer Antigene zur Kreuzreaktionsanalyse geblottet. Für alle drei Antikörper konnte die spezifische Detektion des verwendeten Antigens nachgewiesen werden. Außerdem konnte für den FANCM-Antikörper die Detektion von heterolog exprimiertem FANCM gezeigt werden. Die Analyse des RTEL1-C-Antigens im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel zeigt, dass das heterolog exprimierte Proteinfsegment wohl die Hauptbande und damit auch den größten Anteil des Proteins in der zur Immunisierung verwendeten Probe darstellt. Allerdings wird auch ein höhermolekulares Protein sichtbar, das als Kontamination nach der Aufreinigung zurückgeblieben sein muss. Dieses wird natürlich auch durch die Antikörper erkannt und könnte so zu Fehlsignalen in späteren Anwendungen führen. Allerdings werden spätere Anwendungen in Arabidopsis ausgeführt und so kann diese Subpopulation von Antikörpern wahrscheinlich vernachlässigt werden, da sie kein Antigen findet.

Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Antikörpern können nun die Proteine RTEL1 und FANCM immunologisch detektiert werden. Dazu müssen zunächst die geeigneten Verdünnungen ermittelt werden. Als Negativkontrollen dazu fungieren dann die jeweiligen Mutanten und die zugehörigen Präimmunsereen. So können dann am Lehrstuhl Botanik II weitere Erkenntnisse über die Beteiligung von RTEL1 und FANCM in der Meiose erlangt und es kann ein detailliertes Bild der Funktionen von RTEL1 und FANCM erstellt werden.

4.3. Immunolokalisation in *Arabidopsis thaliana*

Die von Armstrong *et al.* (2009) beschriebene Methode der Immunolokalisation in *Arabidopsis thaliana* Pollenmutterzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl Botanik II etabliert, um die am Lehrstuhl identifizierten T-DNA-Insertionsmutanten auch im Hinblick auf die meiotische Rekombination näher charakterisieren zu können. Zudem sollte die Möglichkeit der Untersuchung von am Lehrstuhl relevanten Proteinen in der Meiose durch Immunolokalisation über hergestellte eigene Antikörper geschaffen werden. Die Etablierung erfolgte zunächst über den Antikörper ASY1, der die sich entwickelnden Chromatinachsen in der Prophase I markiert (Armstrong *et al.* 2002; Sanchez-Moran *et al.* 2007; Sanchez-Moran *et al.* 2008). Die Genese der Chromatinachsen konnte dadurch von der Ausbildung unzähliger Foci bis hin zur Ansammlung des Proteins auf den Achsen verfolgt werden. Durch das Zusammenrücken der Achsen in der Synapsis ist diese auch über die Ausbildung dickerer Stränge des ASY1-Signals erkennbar. Auch über Chromatinpräparationen kann eine Aussage zur Ausbildung von Synapsis bzw. zum Bestehen von asynaptischen Bereichen getroffen werden, aber das Entstehen der ZYP1-Achse aus diversen ZYP1-Foci ist ein sicheres Merkmal zur Bestimmung erfolgter Synapsis (Higgins *et al.* 2005;

Osman *et al.* 2006). Dies konnte durch die Lokalisation von ZYP1 zuerst in Foci und dann nach Ausbildung der Synapsis in dicken Strängen im Wildtyp beobachtet werden.

Um DMC1 und RAD51 jeweils gemeinsam mit ASY1 lokalisieren zu können, musste die Methode erweitert werden, da hierfür Antikörper aus derselben Spezies auf einem Präparat verwenden werden mussten. Prinzipiell kommen dafür die Methoden der Primärantikörpermarkierung und die Verwendung von Fab-Fragmenten statt Gesamt-Antikörpern in Frage (Negoescu *et al.* 1994). Eine Markierung der Primärantikörper macht die Verwendung eines Sekundärantikörpers überflüssig. Dadurch geht allerdings der Amplifikationseffekt verloren, der dadurch entsteht, dass ein Primärantikörper von mehr als einem Sekundärantikörper detektiert wird. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Verwendung von Fab-Fragmenten etabliert. Diese sind Fragmente von IgG-Antikörpern, bei denen der konstante Teil abgetrennt wurde. Die Fab-Fragmente wurden bei der Detektion des ersten Primärantikörpers im Überschuss eingesetzt, um diesen vollständig abzudecken. Zusätzlich sollte eine Nachfixierung dafür garantieren, dass sich kein erster Sekundärantikörper in nachfolgenden Inkubationsschritten löst und damit zu einer Fehldetektion des zweiten Primärantikörpers führen kann. Bei der Detektion des zweiten Primärantikörpers mit dem zweiten Sekundärantikörper war der erste Primärantikörper dadurch maskiert und konnte nicht erkannt werden. So konnten jeweils ASY1 und RAD51 bzw. ASY1 und DMC1 simultan detektiert werden. Im Wildtyp sind jeweils viele Foci für RAD51 und DMC1 detektierbar, die frühe Rekombinationsintermediate darstellen (Alonso *et al.* 2003; Higgins *et al.* 2004; Chelysheva *et al.* 2007; Sanchez-Moran *et al.* 2007; Vignard *et al.* 2007). Dies wurde durch die Abwesenheit von Foci in den jeweiligen Mutanten bestätigt.

Die Lokalisation von MSH4 zeigt Intermediate der Crossover-Bildung über den Klasse I-Weg der Interferenz-sensitiven Crossover (Higgins *et al.* 2004). Dabei co-lokalisiert MSH4 in der frühen Phase der meiotischen Rekombination mit den Rekombinasen RAD51 und DMC1 in vielen Foci. Späte MSH4-Foci markieren neben den Intermediaten zur Bildung Interferenz-sensitiven Crossovern eventuell auch den Teil der Rekombinationsintermediate, die durch Dissolution über den RTR-Komplex in Non-Crossover aufgelöst werden (Osman *et al.* 2011). Die Lokalisation von MSH4 neben ASY1 im Wildtyp zeigte eine Lokalisation der MSH4-Foci auf den Chromatinachsen, wie in der zuvor genannten Literatur beschrieben. Die Spezifität des Antikörpers konnte wiederum über ein Fehlen von Signalen in der *msh4-1*-Mutante bestätigt werden.

Durch die Etablierung der Methode der Immunlokalisation mit den von F. Christopher H. Franklin (School of Biosciences, University of Birmingham) zur Verfügung gestellten Antikörpern wird nun die Untersuchung der Lokalisation der entsprechenden Proteine in der Meiose von am Lehrstuhl Botanik II charakterisierten Mutanten ermöglicht. Außerdem können in Zukunft am Lehrstuhl auch eigene Antikörper zur Immunlokalisation verwendet werden.

4.4. Immunolokalisation in Mutanten der meiotischen Rekombination in *Arabidopsis thaliana*

4.4.1. Immunolokalisation in Mutanten von AtFANCM

FANCM im Menschen ist eine DNA-Translokase, die eine entscheidende Rolle in der Erhaltung der Integrität stehengebliebener Replikationsgabeln und im FA-Signalweg zur Homologie-vermittelten Reparatur von ICLs spielt (zur Übersicht siehe Collis und Boulton 2010). Das Homolog der Bäckerhefe ScMph1 hingegen ist eine echte DNA-Helikase (Prakash *et al.* 2005; Prakash *et al.* 2009) und auch an der HR-vermittelten Schadenreparatur in der Replikation beteiligt (Schürer *et al.* 2004; Panico *et al.* 2010). Für das Homolog in *Arabidopsis* AtFANCM konnte neben einer Rolle in der somatischen auch eine Rolle in der meiotischen HR nachgewiesen werden (Knoll 2011). Daher sollte die *fancm-1*-Mutante auch über die Methode der Immunolokalisation von Proteinen der meiotischen HR untersucht werden, um Hinweise auf eine genauere Einordnung vom FANCM in die verschiedenen Zweige meiotischer HR zu erhalten.

Durch die antirekombinogene Aktivität, die allen FANCM-Homologen, darunter auch AtFANCM nachgewiesen wurde, liegt es nahe, auch in der Meiose eine Beteiligung von AtFANCM im SDSA-Zweig der Auflösung von D-Loop-Intermediaten zu Non-Crossover-Produkten zu postulieren. Über die Immunolokalisation konnte eine Ausbildung der Chromatinachse und der Synapsis in der *fancm-1*-Mutante bestätigt werden. Außerdem war es möglich die Bildung früher Rekombinationsintermediate nachzuweisen. Zudem konnten zahlreiche frühe MSH4-Foci beobachtet werden. Ein Verlust der MSH4-Funktion kann in *Arabidopsis* nicht durch die vermehrte Ausbildung von Klasse II Crossovern kompensiert werden: die Einzelmutante zeigt eine stark verminderte Crossoverrate (Higgins *et al.* 2004). Daher kann davon ausgegangen werden, dass ein Signal bestehen muss, das eine zusätzliche Förderung des Klasse I Crossover-Wegs auch in einer *msh4*-Mutante und damit eine Ableitung der Rekombinationsintermediate in den Weg zur Bildung von Klasse II Crossovern verhindert. Zieht man in Betracht, dass für FANCM in der somatischen homologen Rekombination unter Induktion von Doppelstrangbrüchen durch Bleomycin eine Crossover-fördernde Rolle beschrieben werden konnte (Knoll 2011), kann in der Meiose für FANCM eine regulierende Rolle in der Verteilung von Rekombinationsintermediaten auf die nachfolgenden Wege der Prozessierung zu Crossovern und Non-Crossovern postuliert werden. Dabei könnte FANCM MSH4-gebundene frühe Rekombinationsintermediate über eine Helikase/Translokase-Aktivität stabilisieren. Ein Ausfall von FANCM würde zu einer Destabilisierung MSH4-gebundener Rekombinationsintermediate führen, die dann eventuell

für den Klasse II-Crossover-Weg zugänglich werden könnten. Dies würde ein komplexes Zusammenspiel von MSH4 und FANCM postulieren. Dies entspricht auch neuesten Forschungsergebnissen aus der Bäckerhefe, in denen für das FANCM-Homolog Mph1 neben der Entwindung von D-Loop-Intermediaten auch eine D-Loop-stabilisierende Funktion nachgewiesen werden konnte (Panico *et al.* 2010; Ede *et al.* 2011).

4.4.2. Immunolokalisation in Mutanten von AtRTEL1

Die Antirekombinase RTEL1 ist im tierischen System am Telomererhalt und in der somatischen Rekombination beteiligt (Ding *et al.* 2004; Barber *et al.* 2008, Übersicht in Uringa *et al.* 2011). In *C. elegans* konnte außerdem eine meiotische Funktion in der Suppression und Regulation von Crossover-Ereignissen beschrieben werden (Youds *et al.* 2010). CeRTEL1 kann daher dem SDSA-Zweig der meiotischen Rekombination zugeordnet werden. Auch in Arabidopsis konnte ein Homolog zu RTEL1 identifiziert werden, das somatisch als Antirekombinase wirkt (Knoll 2011). In der Meiose konnte für AtRTEL1 eine Rolle im Telomermetabolismus und in der Schwesterchromatidkohäsion postuliert werden. Mit der Methode der Immunolokalisation von Schlüsselproteinen der meiotischen Rekombination in der *rte1-1*-Mutante sollte daher die Beteiligung von RTEL1 in der Meiose von Pollenmutterzellen genauer definiert werden.

In *rte1-1* konnte keine Beeinträchtigung der Chromatinachsenbildung und Synapsis gefunden werden. Außerdem wird die Rekombination wie im Wildtyp eingeleitet und stabilisiert. Der Weg zur Bildung Interferenz-sensitiver Crossover ist also nicht eingeschränkt. Da RTEL1 in Arabidopsis auch somatisch als Antirekombinase wirkt, bestätigen die erhaltenen Ergebnisse die These, dass RTEL1 auch in der Meiose im SDSA-Weg der Auflösung von Rekombinationsintermediaten zu Non-Crossovers beteiligt ist. Dies deckt sich mit der Funktion, die in *C. elegans* beschrieben wurde.

4.4.3. Immunolokalisation in Mutanten von AtTOP3 α und AtRMI1

Die Topoisomerase TOP3 α und die Strukturproteine RMI1 und RMI2 bilden gemeinsam mit der RecQ-Helikase BLM im Menschen den sogenannten RTR-Komplex zur Dissolution doppelter Holliday-Junctions über eine Hemicatenanstruktur in Non-Crossover-Produkte (Chu und Hickson 2009). Auch für Arabidopsis wurde die Existenz des RTR-Komplexes als Dissolvasom postuliert (Hartung *et al.* 2008). Mutanten von TOP3 α und RMI1 sind

homozygot steril und zeigen nach drastischen Defekten einen Abbruch der Meiose nach Meiose I (Chelysheva *et al.* 2008; Hartung *et al.* 2008). Durch den Vergleich der Anzahl später MSH4-Foci mit der Anzahl daraus resultierender Crossover wurde postuliert, dass über die Dissolution ein Teil der MSH4-markierten doppelten Holliday-Junctions zu Non-Crossovers aufgelöst wird (Osman *et al.* 2011). Immunolokalisation in einer *rmi1*-Mutante von Arabidopsis zeigten die Chromatinachsenbildung, des Weiteren die Ausbildung der Synapsis und keine Beeinträchtigung der DMC1-Lokalisation (Chelysheva *et al.* 2008). Um die Einordnung des Dissolutionswegs zur Bildung von Non-Crossovers in den Ablauf der meiotischen Rekombination zu überprüfen, sollte wiederum in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation der in Kapitel 3.3 eingeführten Schlüsselproteine in der Meiose von Pollenmutterzellen von *rmi1-1* und *top3α-2* überprüft werden.

In beiden Mutanten waren die Chromatinachsenbildung und die Synapsis nicht beeinträchtigt. Dies entspricht den Befunden, die über Chromatinpräparation erhalten wurden. Zudem konnte die Bildung früher Rekombinationsintermediate und deren Stabilisierung auch in *rmi1-1* und *top3α-2* über Immunolokalisation von RAD51, DMC1 und MSH4 nachgewiesen werden. So konnten die bereits vorhandenen Erkenntnisse für die *rmi1*-Mutante (siehe oben) in der vorliegenden Arbeit bestätigt und um die Lokalisation weiterer Schlüsselproteine erweitert werden. Zudem wurde zum ersten Mal eine Mutante von TOP3α über die Methode der Immunolokalisation in der Meiose untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse positionieren den RTR-Komplex zur Dissolution doppelter Holliday-Junctions erwartungsgemäß nach der Stabilisierung früher Rekombinationsintermediate durch MSH4. Über die Untersuchung von Doppelmutanten von MUS81 und MSH4 in Arabidopsis konnte von Higgins *et al.* ein zweiter Weg der Bildung von Crossover nachgewiesen werden, der parallel zum MSH4-abhängigen Weg verläuft und an dem MUS81 beteiligt ist (Higgins *et al.* 2008a). Dieser führt zur Bildung Interferenz-insensitiver Crossover. Einen Zusammenhang zwischen dem Dissolutionsweg und dem Weg zur Bildung Interferenz-insensitiver Crossover über MUS81 konnte mithilfe der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper nicht untersucht werden. Da allerdings in der somatischen homologen Rekombination MUS81-EME1A/B und der RTR-Komplex um die Auflösung doppelter Holliday-Junctions konkurrieren (Hartung *et al.* 2006; Hartung *et al.* 2007a; Hartung *et al.* 2008; Geuting *et al.* 2009), liegt die Theorie nahe, dass auch in der meiotischen Rekombination doppelte Holliday-Junctions als Intermediate des Wegs zur Bildung Interferenz-insensitiver Crossover durch den RTR-Komplex aufgelöst werden können.

4.4.4. Immunolokalisation in Mutanten von AtRAD51 und AtBRCA2

BRCA2 fungiert im Menschen als Mediator der RAD51-vermittelten Stranginvasion in der homologen Rekombination (Übersicht in Thorslund und West 2007; Holloman 2011; Liu und

Heyer 2011). Dabei fördert BRCA2 die Polymerisation von RAD51 zu Filamenten auf einzelsträngiger DNA *in vitro* und kann so die Homologiesuche und Stranginvasion *in vivo* initiieren (Jensen *et al.* 2010; Liu *et al.* 2010a; Thorslund *et al.* 2010). HsBRCA2 interagiert auch mit dem RAD51-Paralog DMC1 und ist so auch in die Initiation der meiotischen Rekombination durch Stranginvasion in das homologe Chromosom involviert (Thorslund *et al.* 2007). Auch die Arabidopsis-Homologe der Rekombinasen RAD51 und DMC1 spielen eine essentielle Rolle in der Bildung früher Rekombinationsintermediate in der meiotischen Rekombination (Couteau *et al.* 1999; Li *et al.* 2004). Der Ausfall von RAD51 und DMC1 führte hierbei zu einem asynaptischen Phänotyp und einem Ausbleiben der Bivalentbildung. Zusätzlich konnte in der Mutante von RAD51 starke Chromosomenfragmentierung beobachtet werden, die nicht beim Ausfall von DMC1 auftrat (Li *et al.* 2004). Eine Doppelmutante zeigte den *rad51*-Phänotyp (Vignard *et al.* 2007). Immunlokalisation in Mutanten von RAD51 und DMC1 in Arabidopsis im Rahmen derselben Studie zeigten bereits eine starke Beeinträchtigung der Synapsis. Außerdem wurde in einer Mutante von RAD51 eine stark eingeschränkte Bildung von DMC1-Foci gezeigt. Daher wurde postuliert, dass RAD51 wesentlich für die Prozessierung der induzierten Doppelstrangbrüche ist und DMC1 die gezielte Invasion in das homologe Chromosom zur Bildung von Chiasmata vermittelt (Vignard *et al.* 2007).

Für BRCA2 wurden in *Arabidopsis thaliana* zwei Homologe identifiziert, für die eine redundante Rolle in der meiotischen Rekombination nachgewiesen werden konnte (Siaud *et al.* 2004; Seeliger *et al.* 2011). Die Doppelmutante *brca2* zeigt in Chromatinpräparationen den *rad51-1*-Phänotyp, der auf die fehlende Prozessierung der induzierten Doppelstrangbrüche zurückgeführt werden kann (Li *et al.* 2004; Seeliger *et al.* 2011). Allerdings waren bisher keine Erkenntnisse über eine Mediatorfunktion von BRCA2 in Arabidopsis vorhanden. Vergleichende Immunlokalisation in *rad51-1* und *brca2* sollte daher die Frage beantworten, ob BRCA2 auch in Arabidopsis die Rolle des Mediators zur RAD51- und DMC1-vermittelten homologen Rekombination einnimmt.

Die *rad51-1*-Mutante zeigte keine Beeinträchtigung der Chromatinachsenbildung, jedoch keine Synapsis. Es konnte zudem eine drastische Beeinträchtigung der meiotischen Rekombination ab der Stranginvasion beobachtet werden. Dies bestätigt und erweitert die bisher für Mutanten von RAD51 erhaltenen Erkenntnisse. Die Immunlokalisation in der *brca2*-Doppelmutante zeigte auch einen asynaptischen Phänotyp. Durch den Ausfall von BRCA2 wird die korrekte Lokalisation der Rekombinasen RAD51 und DMC1 verhindert und somit die homologe Rekombination ab dem Zeitpunkt der Stranginvasion drastisch gestört. Über die Abwesenheit von RAD51- und DMC1-Foci in der *brca2*-Doppelmutante konnte damit in dieser Arbeit zum ersten Mal in Pflanzen die Mediatorrolle von BRCA2 für die RAD51- und DMC1-vermittelte homologe Rekombination nachgewiesen werden.

4.4.5. Rekombination in der Meiose von *Arabidopsis thaliana*

Aus den Erkenntnissen, die durch die Lokalisation von Schlüsselproteinen in den verschiedenen Mutanten gewonnen wurden, kann in Synthese mit den weiteren bekannten somatischen und meiotischen Phänotypen eine Hypothese zur Einordnung der beteiligten Proteine in den Ablauf der meiotischen Rekombination aufgestellt werden (siehe Abbildung 32).

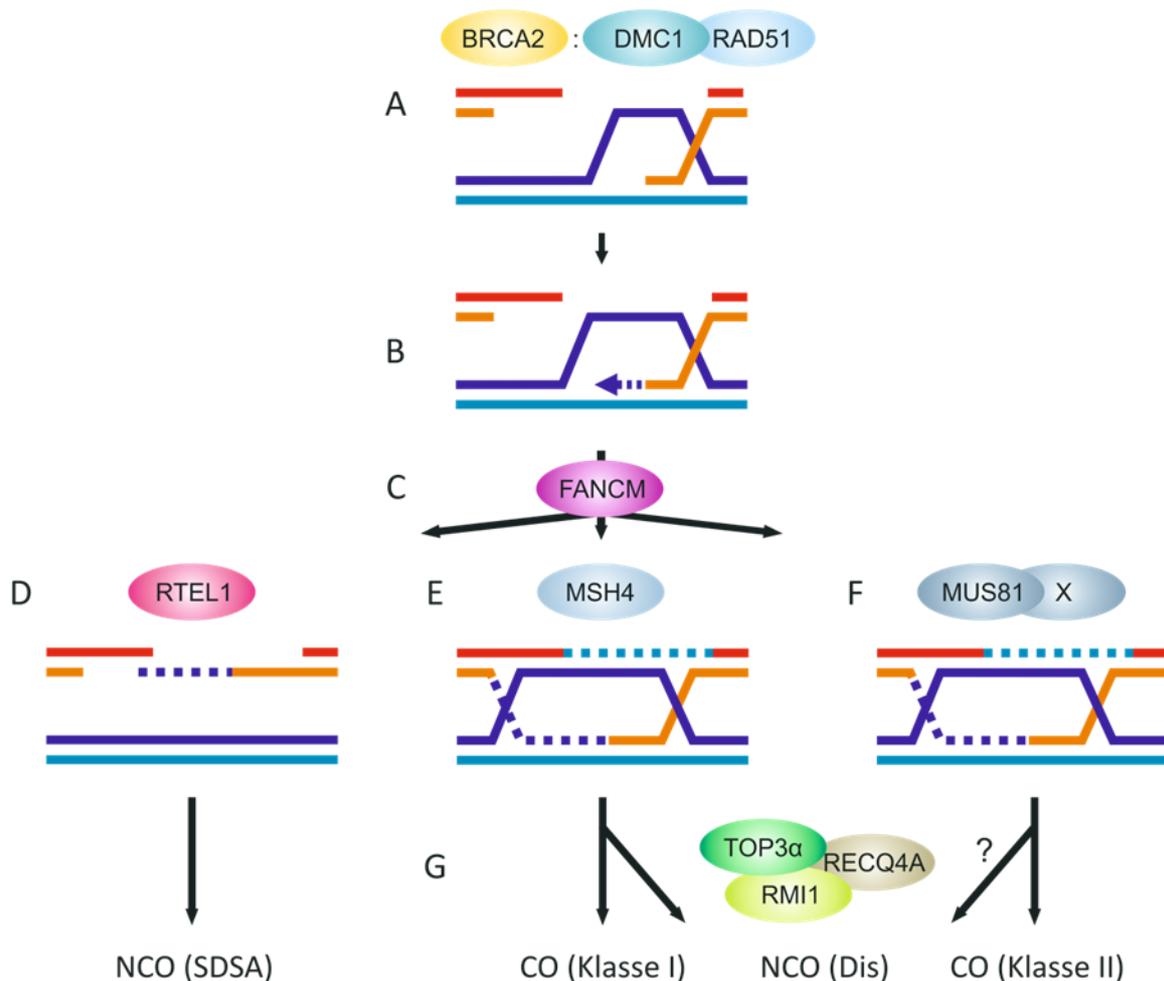


Abbildung 32: Beteiligung der untersuchten Proteine an der meiotischen Rekombination. (A) BRCA2 dient auch in *Arabidopsis* als Mediator der DMC1- und RAD51-vermittelten Bildung von Rekombinationsintermediaten. (B) Eine ausgebildete D-Loop-Struktur wird über FANCM und MSH4 stabilisiert, wobei (C) FANCM eine regulierende Rolle bei der weiteren Prozessierung einnimmt. (D) RTKL1 ist im SDSA-Weg der Non-Crossover-Bildung beteiligt. (E) MSH4 fördert die Bildung doppelter Holliday-Junctions und deren Resolution zu Interferenz-sensitiven Crossovers (Klasse I). (F) In einem alternativen Weg zur Bildung Interferenz-insensitiver Crossover ist unter anderem MUS81 beteiligt (Klasse II). (G) Doppelte Holliday-Junctions können über den Weg der Dissolution durch die Proteine des RTR-Komplex aufgelöst werden. Ein Teil der MSH4-stabilisierten späten Rekombinationsintermediate wird so zu Non-Crossovers aufgelöst. Die Beziehung der Dissolution zum Weg der Bildung von Klasse II Crossovers ist noch eindeutig geklärt, aber auch hier erscheint eine Beteiligung an der Prozessierung von späten Rekombinationsintermediaten als wahrscheinlich (NCO = Non-Crossover, CO = Crossover, Dis = Dissolution).

Nach der Initiation der meiotischen Rekombination durch das Einfügen von Doppelstrangbrüchen über SPO11 und der Resektion zu Einzelstrangüberhängen dient BRCA2 auch in *Arabidopsis thaliana* als Mediatorprotein für die DMC1- und RAD51-vermittelte Stranginvasion. Dann kann das Fortschreiten der Doppelstrangbruchreparatur über verschiedene Wege ablaufen. Das Protein RTEL1 scheint im SDSA-Weg zur Bildung von Non-Crossovers involviert zu sein. FANCM könnte bei der Regulation der Verteilung der Intermediate zur Prozessierung auf die verschiedenen nachfolgenden Wege beteiligt sein. Die Dissolution von doppelten Holliday-Junctions durch die Proteine des RTR-Komplexes ist der Stabilisierung doppelter Holliday-Junctions durch MSH4 nachgeordnet. Die Beziehung des RTR-Komplex zum Weg der Genese Interferenz-insensitiver Crossover kann noch nicht eindeutig zugewiesen werden, allerdings legen somatische Daten nahe, dass über den RTR-Komplex auch Intermediate des Wegs zur Bildung Interferenz-insensitiver Crossover zu Non-Crossovers aufgelöst werden können.

Diese Hypothese muss nun in weiterfolgenden Arbeiten validiert und verifiziert werden. Dazu sollten neben der Immunlokalisation weiterer Schlüsselproteine der meiotischen Rekombination auch Mehrfachmutanten generiert werden, mithilfe derer die Beziehung der jeweiligen Proteine untereinander weiter aufgeklärt werden kann.

4.5. Meiose in *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

In der vorliegenden Arbeit konnte die in *Arabidopsis* etablierte Methode zur Chromatinpräparation in der Meiose von Pollenmutterzellen erfolgreich für die Zytologie in Micro-Tom angepasst werden. Micro-Tom hat vielerlei Vorteile, die sie als Modellorganismus im Allgemeinen, aber auch als Modellorganismus zur Untersuchung der Meiose und meiotischer Rekombination im Speziellen in das Blickfeld der pflanzlichen Forschung rücken. Prinzipiell ist Micro-Tom relativ einfach zu kultivieren, kann in hoher Dichte angepflanzt werden, ist ein Selbstbestäuber und hat eine Generationszeit von ca. 10 – 12 Wochen (Meissner *et al.* 1997). Insgesamt kann sie unter ähnlichen Anzuchtbedingungen wie *Arabidopsis thaliana* kultiviert werden. Für die Anzucht der in dieser Arbeit verwendeten Micro-Toms wurden allerdings etwas größere Töpfe als für *Arabidopsis* verwendet und es konnten dadurch Pflanzen erhalten werden, die etwas mehr Knospen ausgebildet und dementsprechend Früchte getragen haben, als bei einem geringem Topfvolumen (Meissner *et al.* 1997). Ein Vorteil vom Micro-Tom gegenüber *Arabidopsis thaliana* bei der Untersuchung der Meiose im Speziellen ist die zytologische Zugänglichkeit der Meiosestadien in Pollenmutterzellen. Auch in Tomaten läuft die Meiose in den

Pollenmutterzellen relativ synchron ab (Stack und Anderson 1986), und so wurde über Chromatinpräparation die Größe der Knospen bestimmt, in denen die Meiose in den Pollenmutterzellen abläuft. Es konnte eine Größenordnung von 2,5 bis 3,0 mm bestimmt werden. In Arabidopsis müssen im Gegensatz dazu für die Präparation meiotischer Zellen Knospen von nur ca. einem Achtel der Größe der Micro-Tom-Knospen präpariert werden (Armstrong und Jones 2003). Eine zusätzliche Verbesserung des Protokolls zur Chromatinpräparation in Micro-Tom im Gegensatz zur Situation in Arabidopsis war – durch die erhöhte Größe der zu präparierenden Knospen – die Möglichkeit der selektiven Präparation von Antheren und das Abtrennen der übrigen Knospenbestandteile. Damit konnte der relative Anteil meiotischer Zellen in der Präparation gesteigert werden. Nach der erfolgreichen Anpassung des Protokolls für die Chromatinpräparation in Micro-Tom konnte in dieser Arbeit erstmals der Ablauf der Meiose in Pollenmutterzellen von Micro-Tom dargestellt werden. Durch die Größe der Stadien lassen sich auch kleinere Details, wie z.B. synapsierte Chromosomen im Pachytän als zwei parallel verlaufende Einzelstränge, gut erkennen. Dies eröffnet die Möglichkeit bei der Untersuchung meiotischer Mutanten von Micro-Tom schon über die Methode der Chromatinpräparation auch kleine Aberrationen erkennen und diskutieren zu können.

Es wurden bereits mehrere Untersuchungen zur Meiose in Tomaten veröffentlicht (siehe z.B. Lhuissier *et al.* 2007; Lohmiller *et al.* 2008; Qiao *et al.* 2011). So konnte z.B. eine sehr genaue Beschreibung der Lokalisation des Proteins MLH1 in späten Rekombinationsknoten, die weiter zu Crossovern prozessiert werden, getroffen werden (Lhuissier *et al.* 2007). Die hohe räumliche Auflösung der Meiosezytologie in Tomate ließ sogar zu, dass die Interferenz von MLH1-positiven im Vergleich zu allen späten Rekombinationsknoten verglichen werden konnte und dadurch die starke Interferenz von Klasse I Crossovern, die mit Beteiligung von MLH1 gebildet werden, bestätigt wurde. Allerdings wurden alle genannten Studien mit der Tomatenvariante *Cherry* durchgeführt, die wesentlich höhere Platzansprüche und eine wesentlich langsamere Entwicklung aufweist als Micro-Tom und erst mehrere Monate nach Aussaat Knospen trägt, die zur Präparation verwendet werden können. Das Kultivar Micro-Tom hingegen vereint alle Vorteile in sich: Ähnlich wie bei der klassischen Modellpflanze Arabidopsis zeigt sie einen schnellen Entwicklungszyklus und geringe Raumanforderungen. Zusätzlich zeigt sie die gute zytologische Zugänglichkeit wie bei anderen Tomatenkultivars. Da inzwischen auch für Micro-Tom eine Vielzahl an Mutanten öffentlich zugänglich gemacht wurde (Saito *et al.* 2011), kann in Zukunft am Lehrstuhl Botanik II auch mit diesen zytologisch gearbeitet werden. Damit empfiehlt sich Micro-Tom als neues, potentes Modellsystem für die pflanzliche Meiosezytologie.

5. Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für viele weitere Untersuchungsansätze und erweitern das Methoden- und Organismenspektrum des Lehrstuhls Botanik II.

Um eine genauere Aussage über die Beteiligung des Proteins SPG48 an der somatischen Rekombination zu erhalten, sollten Doppelmutanten mit bekannten Faktoren der somatischen Rekombination, wie z.B. RecQ4A, MUS81 und RAD5A, hergestellt werden. Außerdem muss eine zweite Mutante von SPG48 ebenfalls auf Hypersensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien untersucht und in den Rekombinationshintergrund gebracht werden, um den Rekombinationsphänotyp der ersten Mutante zu bestätigen. Auch durch eine Komplementationsstudie in *spg48-1* könnte eine Bestätigung des Rekombinationsphänotyps erreicht werden. Da die Helikasefunktion für HsSPG48 bisher nur postuliert und nicht *in vitro* nachgewiesen wurde, könnte die heterologe Expression und *in vitro*-Analyse von AtSPG48 den entscheidenden Nachweis der biochemischen Funktion der SPG48-Proteine erbringen.

Nach der Etablierung der Methode der Immunolokalisation in der Meiose von Pollenmutterzellen in *Arabidopsis thaliana* am Lehrstuhl Botanik II kann diese nun zur Untersuchung von weiteren Mutanten genutzt werden. Damit können weitere etablierte Mutanten, aber auch neu identifizierte Mutanten charakterisiert werden. Zudem sind am Lehrstuhl weitere Antikörper, wie beispielsweise ein MLH1-Antikörper, verfügbar, die nun eingesetzt werden können, um ein detaillierteres Bild der Abläufe in der meiotischen Rekombination zu erhalten. Auch die gewonnenen RTEL1- und FANCM-Antikörper können nun dazu eingesetzt werden, die beiden Proteine näher zu charakterisieren. Dazu kann zunächst die Lokalisation der Proteine in der Meiose des Wildtyps untersucht werden, um eine Beteiligung der beiden Proteine näher zu charakterisieren. Dann können FANCM und RTEL1 auch in meiotischen Mutanten lokalisiert werden, um die Beziehungen der Proteine untereinander aufzuklären.

Neben der Methode der Chromatinpräparation sollten nun auch die Methoden der Immunlokalisation und der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Micro-Tom etabliert werden, um alle meiosezytologischen Methoden auch in Micro-Tom anwenden zu können. Die Tomate Micro-Tom bietet dem Lehrstuhl neben der guten Zugänglichkeit für die Meiosezytologie weitere interessante Forschungsmöglichkeiten. Vor allem im Bereich der grünen Biotechnologie könnte Micro-Tom neben Tabak eingesetzt werden, um in Arabidopsis erforschte Prinzipien auf eine Kulturpflanze zu übertragen. So birgt Micro-Tom ein großes Potenzial, das in Zukunft am Lehrstuhl genutzt werden kann.

6. Zusammenfassung

Somatische und meiotische Rekombination sind streng regulierte Prozesse, die für den Erhalt von Genomstabilität und –flexibilität verantwortlich sind. Dabei sind diese Prozesse hochkonserviert und Erkenntnisse über deren Ablauf und Regulation sind gleichermaßen von intra- und interdisziplinärem Interesse.

SPG48 im Menschen ist mit der erblichen spastischen Spinalparalyse assoziiert und dessen Ausfall führt zu einer Reduktion der somatischen Rekombination. In der vorliegenden Arbeit konnte das Homolog zum menschlichen SPG48 in Arabidopsis identifiziert und näher charakterisiert werden. Es konnte so für SPG48 aus *Arabidopsis thaliana* eine Beteiligung an der somatischen Rekombination gezeigt werden.

FANCM ist im Menschen an der Homologie-vermittelten Reparatur von Intrastrangcrosslinks beteiligt. Für die Antirekombinase RTEL1 konnte neben ihrer Beteiligung am Telomerstoffwechsel in *C. elegans* auch eine meiotische Funktion nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper gegen RTEL1 und FANCM aus Arabidopsis gewonnen. Eine Validierung der gewonnenen Antikörper im Western Blot zeigte eine spezifische Erkennung der zur Immunisierung verwendeten Antigene.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit über die Methode der Immunolokalisation gezeigt werden, dass die Bildung früher Rekombinationsintermediate in Mutanten von FANCM und RTEL1 nicht gestört ist. Für FANCM konnte so eine regulatorische Funktion bei der Verteilung der Rekombinationsintermediate auf die Wege der weiteren Prozessierung postuliert werden. Die Einordnung von RTEL1 in den SDSA-Weg der Non-Crossover-Bildung konnte bekräftigt werden. Immunolokalisation in Mutanten der RTR-Komplexproteine TOP3 α und RMI1 bestätigte die Einordnung der Dissolution von doppelten Holliday-Junctions durch den RTR-Komplex in die späte Phase meiotischer Rekombination. Es konnte weiter gezeigt werden, dass in Abwesenheit von BRCA2 keine Foci der Rekombinasen RAD51 und DMC1 und auch keine Foci des Stabilisatorproteins MSH4 gebildet werden können. So konnte in

dieser Arbeit zum ersten Mal für Pflanzen nachgewiesen werden, dass BRCA2 als Mediator der RAD51- und DMC1-vermittelten Rekombination fungiert.

Die Tomate *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom bietet viele Vorteile, die sie für die Untersuchung der pflanzlichen Meiose anbieten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Ablauf der Meiose in Pollenmutterzellen des Wildtyps zum ersten Mal dargestellt und damit die Grundlage für die weitere Meiosezytologie in Micro-Tom geschaffen werden.

7. Summary

Somatic and meiotic recombination are tightly regulated processes, which preserve genome stability but permit genome flexibility. They are highly conserved throughout all kingdoms of life. Therefore findings on their progression and regulation are of intra- and interdisciplinary interest.

Human SPG48 is associated with hereditary spastic paraplegia, a neurodegenerative disorder. In human cell lines a depletion of SPG48 leads to a reduction of somatic recombination. In this work, a homolog of SPG48 in Arabidopsis was identified and further characterized. AtSPG48 was shown to be involved in somatic recombination processes.

Human FANCM is involved in homology-directed repair of intrastrand crosslinks. HsRTEL1 was shown to be an antirecombinase which is involved in the maintenance of telomeres and also in meiotic recombination. Within this work, polyclonal antibodies against the proteins AtRTEL1 and AtFANCM were generated. Validation of the antibodies was done in Western Blots and specificity for the antigens used for immunization was approved.

Immunolocalization showed that the formation of early recombination intermediates is not disturbed in an *Atrtel1*- and an *Atfancm*-mutant. For FANCM a regulatory role in allocating recombination intermediates to the different pathways could be postulated. Furthermore, the involvement of RTEL1 in the SDSA pathway of crossover avoidance could be affirmed. Immunolocalization in mutants of AtTOP3 α and AtRMI1, which are components of the RTR-complex, confirmed their involvement in late recombination steps. Moreover it could be shown that the lack of BRCA2 blocks the formation of RAD51-, DMC1- and MSH4-foci. Within this work it could be proven for the first time in plants that BRCA2 is a mediator of RAD51- and DMC1-facilitated meiotic recombination.

The tomato variant Micro-Tom is a suitable model organism for studying plant meiosis and meiotic recombination. Within this work, meiosis in Micro-Tom wild type could be displayed for the first time and a basis for further research could be provided.

8. Literaturverzeichnis

- Abe, K., Osakabe, K., Ishikawa, Y., Tagiri, A., Yamanouchi, H., Takyuu, T., Yoshioka, T., Ito, T., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Ichikawa, H. and Toki, S. (2009). "Inefficient double-strand DNA break repair is associated with increased fasciation in Arabidopsis BRCA2 mutants." J Exp Bot **60**(9): 2751-2761.
- Abe, K., Osakabe, K., Nakayama, S., Endo, M., Tagiri, A., Todoriki, S., Ichikawa, H. and Toki, S. (2005). "Arabidopsis RAD51C gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis." Plant Physiol **139**(2): 896-908.
- Allen, C., Ashley, A. K., Hromas, R. and Nickoloff, J. A. (2011). "More forks on the road to replication stress recovery." J Mol Cell Biol **3**(1): 4-12.
- Allers, T. and Lichten, M. (2001). "Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis." Cell **106**(1): 47-57.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. and Ecker, J. R. (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana." Science **301**(5633): 653-657.
- Alvino, G. M., Collingwood, D., Murphy, J. M., Delrow, J., Brewer, B. J. and Raghuraman, M. K. (2007). "Replication in hydroxyurea: it's a matter of time." Mol Cell Biol **27**(18): 6396-6406.
- Amin, A. D., Chaix, A. B., Mason, R. P., Badge, R. M. and Borts, R. H. (2010). "The roles of the Saccharomyces cerevisiae RecQ helicase SGS1 in meiotic genome surveillance." PLoS One **5**(11): e15380.
- Andersen, S. L. and Sekelsky, J. (2010). "Meiotic versus mitotic recombination: two different routes for double-strand break repair: the different functions of meiotic versus mitotic DSB repair are reflected in different pathway usage and different outcomes." Bioessays **32**(12): 1058-1066.
- Anderson, L. K. and Stack, S. M. (2005). "Recombination nodules in plants." Cytogenet Genome Res **109**(1-3): 198-204.

- Antony, E., Tomko, E. J., Xiao, Q., Krejci, L., Lohman, T. M. and Ellenberger, T. (2009). "Srs2 disassembles Rad51 filaments by a protein-protein interaction triggering ATP turnover and dissociation of Rad51 from DNA." *Mol Cell* **35**(1): 105-115.
- Armstrong, S. J., Caryl, A. P., Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2002). "Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*." *J Cell Sci* **115**(Pt 18): 3645-3655.
- Armstrong, S. J., Franklin, F. C. H. and Jones, G. H. (2003). "A meiotic time-course for *Arabidopsis thaliana*." *Sexual Plant Reproduction* **16**(3): 141-149.
- Armstrong, S. J. and Jones, G. H. (2003). "Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana*." *J Exp Bot* **54**(380): 1-10.
- Armstrong, S. J., Sanchez-Moran, E. and Franklin, F. C. (2009). "Cytological analysis of *Arabidopsis thaliana* meiotic chromosomes." *Methods Mol Biol* **558**: 131-145.
- Ashton, T. M., Mankouri, H. W., Heidenblut, A., McHugh, P. J. and Hickson, I. D. (2011). "Pathways for Holliday junction processing during homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **31**(9): 1921-1933.
- Bachrati, C. Z. and Hickson, I. D. (2008). "RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork." *Chromosoma* **117**(3): 219-233.
- Bachrati, C. Z. and Hickson, I. D. (2009). "Dissolution of double Holliday junctions by the concerted action of BLM and topoisomerase IIIalpha." *Methods Mol Biol* **582**: 91-102.
- Barber, L. J., Youds, J. L., Ward, J. D., McIlwraith, M. J., O'Neil, N. J., Petalcorin, M. I., Martin, J. S., Collis, S. J., Cantor, S. B., Auclair, M., Tissenbaum, H., West, S. C., Rose, A. M. and Boulton, S. J. (2008). "RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination." *Cell* **135**(2): 261-271.
- Barlow, A. L., Benson, F. E., West, S. C. and Hulten, M. A. (1997). "Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes." *EMBO J* **16**(17): 5207-5215.
- Baudat, F. and de Massy, B. (2007). "Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis." *Chromosome Res* **15**(5): 565-577.
- Baumann, P., Benson, F. E. and West, S. C. (1996). "Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro." *Cell* **87**(4): 757-766.
- Baute, J. and Depicker, A. (2008). "Base excision repair and its role in maintaining genome stability." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**(4): 239-276.
- Benson, F. E., Stasiak, A. and West, S. C. (1994). "Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA." *EMBO J* **13**(23): 5764-5771.
- Berchowitz, L. E. and Copenhaver, G. P. (2010). "Genetic interference: don't stand so close to me." *Curr Genomics* **11**(2): 91-102.
- Berchowitz, L. E., Francis, K. E., Bey, A. L. and Copenhaver, G. P. (2007). "The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*." *PLoS Genet* **3**(8): e132.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gabelle, D., Varoutas, P. C., Nicolas, A. and Forterre, P. (1997). "An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination." *Nature* **386**(6623): 414-417.
- Bernstein, D. A., Zittel, M. C. and Keck, J. L. (2003). "High-resolution structure of the *E. coli* RecQ helicase catalytic core." *EMBO J* **22**(19): 4910-4921.
- Bernstein, K. A., Gangloff, S. and Rothstein, R. (2010). "The RecQ DNA helicases in DNA repair." *Annu Rev Genet* **44**: 393-417.

- Bishop, D. K., Park, D., Xu, L. and 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**(3): 439-456.
- Blanck, S., Kobbe, D., Hartung, F., Fengler, K., Focke, M. and Puchta, H. (2009). "A SRS2 homolog from *Arabidopsis thaliana* disrupts recombinogenic DNA intermediates and facilitates single strand annealing." Nucleic Acids Res **37**(21): 7163-7176.
- Bleuyard, J. Y., Gallego, M. E., Savigny, F. and White, C. I. (2005). "Differing requirements for the *Arabidopsis* Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair." Plant J **41**(4): 533-545.
- Bleuyard, J. Y., Gallego, M. E. and White, C. I. (2004a). "The *atspo11-1* mutation rescues *atrxc3* meiotic chromosome fragmentation." Plant Mol Biol **56**(2): 217-224.
- Bleuyard, J. Y., Gallego, M. E. and White, C. I. (2004b). "Meiotic defects in the *Arabidopsis* *rad50* mutant point to conservation of the MRX complex function in early stages of meiotic recombination." Chromosoma **113**(4): 197-203.
- Bleuyard, J. Y. and White, C. I. (2004). "The *Arabidopsis* homologue of *Xrcc3* plays an essential role in meiosis." EMBO J **23**(2): 439-449.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. and Schafer, F. (2011). "Reprint of: Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review." Protein Expr Purif.
- Boavida, L. C., Becker, J. D. and Feijo, J. A. (2005). "The making of gametes in higher plants." Int J Dev Biol **49**(5-6): 595-614.
- Bocker, T., Barusevicius, A., Snowden, T., Rasio, D., Guerrette, S., Robbins, D., Schmidt, C., Burczak, J., Croce, C. M., Copeland, T., Kovatich, A. J. and Fishel, R. (1999). "hMSH5: a human MutS homologue that forms a novel heterodimer with hMSH4 and is expressed during spermatogenesis." Cancer Res **59**(4): 816-822.
- Bombarely, A., Menda, N., Teclé, I. Y., Buels, R. M., Strickler, S., Fischer-York, T., Pujar, A., Leto, J., Gosselin, J. and Mueller, L. A. (2011). "The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D1149-1155.
- Börner, G. V., Kleckner, N. and Hunter, N. (2004). "Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis." Cell **117**(1): 29-45.
- Boulton, S. J. (2006). "Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins." Biochem Soc Trans **34**(Pt 5): 633-645.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2007). "RecQ helicases queuing with Srs2 to disrupt Rad51 filaments and suppress recombination." Genes Dev **21**(23): 3019-3026.
- Brettel, K. and Byrdin, M. (2010). "Reaction mechanisms of DNA photolyase." Curr Opin Struct Biol **20**(6): 693-701.
- Bussen, W., Raynard, S., Busygina, V., Singh, A. K. and Sung, P. (2007). "Holliday junction processing activity of the BLM-Topo III α -BLAP75 complex." J Biol Chem **282**(43): 31484-31492.
- Cabrita, L. D. and Bottomley, S. P. (2004). "Protein expression and refolding--a practical guide to getting the most out of inclusion bodies." Biotechnol Annu Rev **10**: 31-50.
- Campos, M. L., Carvalho, R. F., Benedito, V. A. and Peres, L. E. (2010). "Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions." Plant Signal Behav **5**(3): 267-270.

- Carvalho, R. F., Campos, M. L., Pino, L. E., Crestana, S. L., Zsogon, A., Lima, J. E., Benedito, V. A. and Peres, L. E. (2011). "Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research." Plant Methods **7**(1): 18.
- Caryl, A. P., Armstrong, S. J., Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2000). "A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the Arabidopsis meiotic mutant asy1." Chromosoma **109**(1-2): 62-71.
- Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J. L. and Kowalczykowski, S. C. (2010). "DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2." Nature **467**(7311): 112-116.
- Chelysheva, L., Gendrot, G., Vezon, D., Doutriaux, M. P., Mercier, R. and Grelon, M. (2007). "Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not for synapsis completion in Arabidopsis thaliana." PLoS Genet **3**(5): e83.
- Chelysheva, L., Vezon, D., Belcram, K., Gendrot, G. and Grelon, M. (2008). "The Arabidopsis BLAP75/Rmi1 homologue plays crucial roles in meiotic double-strand break repair." PLoS Genet **4**(12): e1000309.
- Chen, C., Zhang, W., Timofejeva, L., Gerardin, Y. and 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." Plant J **43**(3): 321-334.
- Chen, C. F., Chen, P. L., Zhong, Q., Sharp, Z. D. and Lee, W. H. (1999). "Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G(2)/M checkpoint control." J Biol Chem **274**(46): 32931-32935.
- Chen, I. P., Mannuss, A., Orel, N., Heitzeberg, F. and Puchta, H. (2008). "A homolog of ScRAD5 is involved in DNA repair and homologous recombination in Arabidopsis." Plant Physiol **146**(4): 1786-1796.
- Chen, J., Silver, D. P., Walpita, D., Cantor, S. B., Gazdar, A. F., Tomlinson, G., Couch, F. J., Weber, B. L., Ashley, T., Livingston, D. M. and Scully, R. (1998a). "Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells." Mol Cell **2**(3): 317-328.
- Chen, P. L., Chen, C. F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z. D. and Lee, W. H. (1998b). "The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5287-5292.
- Chu, W. K. and Hickson, I. D. (2009). "RecQ helicases: multifunctional genome caretakers." Nat Rev Cancer **9**(9): 644-654.
- Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." Mol Cell **40**(2): 179-204.
- Cleaver, J. E. (1968). "Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum." Nature **218**(5142): 652-656.
- Cole, F., Keeney, S. and Jasin, M. (2010). "Evolutionary conservation of meiotic DSB proteins: more than just Spo11." Genes Dev **24**(12): 1201-1207.
- Collis, S. J. and Boulton, S. J. (2010). "FANCM: fork pause, rewind and play." EMBO J **29**(4): 703-705.
- Connor, F., Bertwistle, D., Mee, P. J., Ross, G. M., Swift, S., Grigorieva, E., Tybulewicz, V. L. and Ashworth, A. (1997). "Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation." Nat Genet **17**(4): 423-430.
- Copenhaver, G. P., Housworth, E. A. and Stahl, F. W. (2002). "Crossover interference in Arabidopsis." Genetics **160**(4): 1631-1639.

- Cotroneo, M. S., Haag, J. D., Zan, Y., Lopez, C. C., Thuwajit, P., Petukhova, G. V., Camerini-Otero, R. D., Gendron-Fitzpatrick, A., Griep, A. E., Murphy, C. J., Dubielzig, R. R. and Gould, M. N. (2007). "Characterizing a rat Brca2 knockout model." Oncogene **26**(11): 1626-1635.
- Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D. and Doutriaux, M. P. (1999). "Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a dmc1 mutant of Arabidopsis." Plant Cell **11**(9): 1623-1634.
- Dan, Y., Yan, H., Munyikwa, T., Dong, J., Zhang, Y. and Armstrong, C. L. (2006). "MicroTom--a high-throughput model transformation system for functional genomics." Plant Cell Rep **25**(5): 432-441.
- Darlington, C. D. (1977). "Meiosis in perspective." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **277**(955): 185-189.
- Davies, O. R. and Pellegrini, L. (2007). "Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats." Nat Struct Mol Biol **14**(6): 475-483.
- de Boer, E., Stam, P., Dietrich, A. J., Pastink, A. and Heyting, C. (2006). "Two levels of interference in mouse meiotic recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(25): 9607-9612.
- de los Santos, T., Hunter, N., Lee, C., Larkin, B., Loidl, J. and Hollingsworth, N. M. (2003). "The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast." Genetics **164**(1): 81-94.
- De Muyt, A., Pereira, L., Vezon, D., Chelysheva, L., Gendrot, G., Chambon, A., Laine-Choinard, S., Pelletier, G., Mercier, R., Nogue, F. and Grelon, M. (2009a). "A high throughput genetic screen identifies new early meiotic recombination functions in Arabidopsis thaliana." PLoS Genet **5**(9): e1000654.
- De Muyt, A., Vezon, D., Gendrot, G., Gallois, J. L., Stevens, R. and Grelon, M. (2007). "AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in Arabidopsis thaliana." EMBO J **26**(18): 4126-4137.
- De Muyt, A. D., Mercier, R., Mezard, C. and Grelon, M. (2009b). "Meiotic recombination and crossovers in plants." Genome Dyn **5**: 14-25.
- de Vries, S. S., Baart, E. B., Dekker, M., Siezen, A., de Rooij, D. G., de Boer, P. and te Riele, H. (1999). "Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis." Genes Dev **13**(5): 523-531.
- Dean, P. J., Siwiec, T., Waterworth, W. M., Schlogelhofer, P., Armstrong, S. J. and West, C. E. (2009). "A novel ATM-dependent X-ray-inducible gene is essential for both plant meiosis and gametogenesis." Plant J **58**(5): 791-802.
- Deans, A. J. and West, S. C. (2011). "DNA interstrand crosslink repair and cancer." Nat Rev Cancer **11**(7): 467-480.
- Deleage, G., Combet, C., Blanchet, C. and Geourjon, C. (2001). "ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities." Comput Biol Med **31**(4): 259-267.
- Ding, H., Schertzer, M., Wu, X., Gertsenstein, M., Selig, S., Kammori, M., Pourvali, R., Poon, S., Vulto, I., Chavez, E., Tam, P. P., Nagy, A. and Lansdorp, P. M. (2004). "Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein." Cell **117**(7): 873-886.

- Dion, E., Li, L., Jean, M. and Belzile, F. (2007). "An Arabidopsis MLH1 mutant exhibits reproductive defects and reveals a dual role for this gene in mitotic recombination." Plant J **51**(3): 431-440.
- Domenichini, S., Raynaud, C., Ni, D. A., Henry, Y. and Bergounioux, C. (2006). "Atmnd1-delta1 is sensitive to gamma-irradiation and defective in meiotic DNA repair." DNA Repair (Amst) **5**(4): 455-464.
- Dray, E., Siaud, N., Dubois, E. and Doutriaux, M. P. (2006). "Interaction between Arabidopsis Brca2 and its partners Rad51, Dmc1, and Dss1." Plant Physiol **140**(3): 1059-1069.
- Dupaigne, P., Le Breton, C., Fabre, F., Gangloff, S., Le Cam, E. and Veaute, X. (2008). "The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA: implications for crossover incidence during mitotic recombination." Mol Cell **29**(2): 243-254.
- Eady, C., Lindsey, K. and Twell, D. (1995). "The Significance of Microspore Division and Division Symmetry for Vegetative Cell-Specific Transcription and Generative Cell Differentiation." Plant Cell **7**(1): 65-74.
- Eastman, A. (1985). "Interstrand cross-links and sequence specificity in the reaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA." Biochemistry **24**(19): 5027-5032.
- Ede, C., Rudolph, C. J., Lehmann, S., Schurer, K. A. and Kramer, W. (2011). "Budding yeast Mph1 promotes sister chromatid interactions by a mechanism involving strand invasion." DNA Repair (Amst) **10**(1): 45-55.
- Edelmann, W., Cohen, P. E., Kneitz, B., Winand, N., Lia, M., Heyer, J., Kolodner, R., Pollard, J. W. and Kucherlapati, R. (1999). "Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis." Nat Genet **21**(1): 123-127.
- Emmanuel, E. and Levy, A. A. (2002). "Tomato mutants as tools for functional genomics." Curr Opin Plant Biol **5**(2): 112-117.
- Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M. and West, S. C. (2005). "CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair." Nature **434**(7033): 598-604.
- Esashi, F., Galkin, V. E., Yu, X., Egelman, E. H. and West, S. C. (2007). "Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2." Nat Struct Mol Biol **14**(6): 468-474.
- Espinosa, C. and Palau, F. (2009). "Genetics and pathogenesis of inherited ataxias and spastic paraplegias." Adv Exp Med Biol **652**: 263-296.
- Faure, J. E. (2001). "Double fertilization in flowering plants: discovery, study methods and mechanisms." C R Acad Sci III **324**(6): 551-558.
- Feller, L., Wood, N. H., Motswaledi, M. H., Khammissa, R. A., Meyer, M. and Lemmer, J. (2010). "Xeroderma pigmentosum: a case report and review of the literature." J Prev Med Hyg **51**(2): 87-91.
- Fortini, P. and Dogliotti, E. (2007). "Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways." DNA Repair (Amst) **6**(4): 398-409.
- Franklin, F. C., Higgins, J. D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S. J., Osman, K. E., Jackson, N. and Jones, G. H. (2006). "Control of meiotic recombination in Arabidopsis: role of the MutL and MutS homologues." Biochem Soc Trans **34**(Pt 4): 542-544.
- Frappart, P. O., Lee, Y., Lamont, J. and McKinnon, P. J. (2007). "BRCA2 is required for neurogenesis and suppression of medulloblastoma." EMBO J **26**(11): 2732-2742.
- Fung, J. C., Rockmill, B., Odell, M. and Roeder, G. S. (2004). "Imposition of crossover interference through the nonrandom distribution of synapsis initiation complexes." Cell **116**(6): 795-802.

- Galkin, V. E., Esashi, F., Yu, X., Yang, S., West, S. C. and Egelman, E. H. (2005). "BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8537-8542.
- Gangloff, S., de Massy, B., Arthur, L., Rothstein, R. and Fabre, F. (1999). "The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination." EMBO J **18**(6): 1701-1711.
- Gari, K., Decaillet, C., Delannoy, M., Wu, L. and Constantinou, A. (2008a). "Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16107-16112.
- Gari, K., Decaillet, C., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. and Constantinou, A. (2008b). "The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks." Mol Cell **29**(1): 141-148.
- German, J., Archibald, R. and Bloom, D. (1965). "Chromosomal Breakage in a Rare and Probably Genetically Determined Syndrome of Man." Science **148**: 506-507.
- Geuting, V., Kobbe, D., Hartung, F., Durr, J., Focke, M. and Puchta, H. (2009). "Two distinct MUS81-EME1 complexes from Arabidopsis process Holliday junctions." Plant Physiol **150**(2): 1062-1071.
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J. and Lopez, R. (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI." Nucleic Acids Res **38**(Web Server issue): W695-699.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G. and Pelletier, G. (2001). "AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants." EMBO J **20**(3): 589-600.
- Grossniklaus, U. and Schneitz, K. (1998). "The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development." Semin Cell Dev Biol **9**(2): 227-238.
- Gupta, R. C., Bazemore, L. R., Golub, E. I. and Radding, C. M. (1997). "Activities of human recombination protein Rad51." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 463-468.
- Gupta, R. C., Golub, E., Bi, B. and Radding, C. M. (2001). "The synaptic activity of HsDmc1, a human recombination protein specific to meiosis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8433-8439.
- Haaf, T., Golub, E. I., Reddy, G., Radding, C. M. and Ward, D. C. (1995). "Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 2298-2302.
- Hamoir, G. (1992). "The discovery of meiosis by E. Van Beneden, a breakthrough in the morphological phase of heredity." Int J Dev Biol **36**(1): 9-15.
- Hanein, S., Martin, E., Boukhris, A., Byrne, P., Goizet, C., Hamri, A., Benomar, A., Lossos, A., Denora, P., Fernandez, J., Elleuch, N., Forlani, S., Durr, A., Feki, I., Hutchinson, M., Santorelli, F. M., Mhiri, C., Brice, A. and Stevanin, G. (2008). "Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome." Am J Hum Genet **82**(4): 992-1002.
- Harrison, C. J., Alvey, E. and Henderson, I. R. (2010). "Meiosis in flowering plants and other green organisms." J Exp Bot **61**(11): 2863-2875.
- Harsch, A., Marzilli, L. A., Bunt, R. C., Stubbe, J. and Vouros, P. (2000). "Accurate and rapid modeling of iron-bleomycin-induced DNA damage using tethered duplex oligonucleotides and electrospray ionization ion trap mass spectrometric analysis." Nucleic Acids Res **28**(9): 1978-1985.
- Hartung, F. and Puchta, H. (2000). "Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in Arabidopsis thaliana." Nucleic Acids Res **28**(7): 1548-1554.

- Hartung, F. and Puchta, H. (2001). "Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants." Gene **271**(1): 81-86.
- Hartung, F., Suer, S., Bergmann, T. and Puchta, H. (2006). "The role of AtMUS81 in DNA repair and its genetic interaction with the helicase AtRecQ4A." Nucleic Acids Res **34**(16): 4438-4448.
- Hartung, F., Suer, S., Knoll, A., Wurz-Wildersinn, R. and Puchta, H. (2008). "Topoisomerase 3alpha and RMI1 suppress somatic crossovers and are essential for resolution of meiotic recombination intermediates in Arabidopsis thaliana." PLoS Genet **4**(12): e1000285.
- Hartung, F., Suer, S. and Puchta, H. (2007a). "Two closely related RecQ helicases have antagonistic roles in homologous recombination and DNA repair in Arabidopsis thaliana." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18836-18841.
- Hartung, F., Wurz-Wildersinn, R., Fuchs, J., Schubert, I., Suer, S. and Puchta, H. (2007b). "The catalytically active tyrosine residues of both SPO11-1 and SPO11-2 are required for meiotic double-strand break induction in Arabidopsis." Plant Cell **19**(10): 3090-3099.
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T. and Liu, J. (2010). "Regulation of homologous recombination in eukaryotes." Annu Rev Genet **44**: 113-139.
- Higgins, J. D., Armstrong, S. J., Franklin, F. C. and 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 Dev **18**(20): 2557-2570.
- Higgins, J. D., Buckling, E. F., Franklin, F. C. and Jones, G. H. (2008a). "Expression and functional analysis of AtMUS81 in Arabidopsis meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over." Plant J **54**(1): 152-162.
- Higgins, J. D., Ferdous, M., Osman, K. and Franklin, F. C. (2011). "The RecQ helicase AtRECQ4A is required to remove inter-chromosomal telomeric connections that arise during meiotic recombination in Arabidopsis." Plant J **65**(3): 492-502.
- Higgins, J. D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S. J., Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2005). "The Arabidopsis synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over." Genes Dev **19**(20): 2488-2500.
- Higgins, J. D., Vignard, J., Mercier, R., Pugh, A. G., Franklin, F. C. and Jones, G. H. (2008b). "AtMSH5 partners AtMSH4 in the class I meiotic crossover pathway in Arabidopsis thaliana, but is not required for synapsis." Plant J **55**(1): 28-39.
- Hilliers, K. J. (2004). "Crossover interference." Curr Biol **14**(24): R1036-1037.
- Ho, T. V. and Scharer, O. D. (2010). "Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair." Environ Mol Mutagen **51**(6): 552-566.
- Hoadley, K. A., Xu, D., Xue, Y., Satyshur, K. A., Wang, W. and Keck, J. L. (2010). "Structure and cellular roles of the RMI core complex from the bloom syndrome dissolvasome." Structure **18**(9): 1149-1158.
- Hollingsworth, N. M., Ponte, L. and Halsey, C. (1995). "MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in Saccharomyces cerevisiae but not mismatch repair." Genes Dev **9**(14): 1728-1739.
- Holloman, W. K. (2011). "Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination." Nat Struct Mol Biol **18**(7): 748-754.
- Holloway, J. K., Morelli, M. A., Borst, P. L. and Cohen, P. E. (2010). "Mammalian BLM helicase is critical for integrating multiple pathways of meiotic recombination." J Cell Biol **188**(6): 779-789.

- Holthausen, J. T., Wyman, C. and Kanaar, R. (2010). "Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination." DNA Repair (Amst) **9**(12): 1264-1272.
- Hong, E. L., Shinohara, A. and Bishop, D. K. (2001). "Saccharomyces cerevisiae Dmc1 protein promotes renaturation of single-strand DNA (ssDNA) and assimilation of ssDNA into homologous super-coiled duplex DNA." J Biol Chem **276**(45): 41906-41912.
- Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V. and Modrich, P. L. (2006). "DNA mismatch repair: functions and mechanisms." Chem Rev **106**(2): 302-323.
- Jackson, N., Sanchez-Moran, E., Buckling, E., Armstrong, S. J., Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2006). "Reduced meiotic crossovers and delayed prophase I progression in AtMLH3-deficient Arabidopsis." EMBO J **25**(6): 1315-1323.
- Jean, M., Pelletier, J., Hilpert, M., Belzile, F. and Kunze, R. (1999). "Isolation and characterization of AtMLH1, a MutL homologue from Arabidopsis thaliana." Mol Gen Genet **262**(4-5): 633-642.
- Jensen, R. B., Carreira, A. and Kowalczykowski, S. C. (2010). "Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination." Nature **467**(7316): 678-683.
- Jeppesen, D. K., Bohr, V. A. and Stevnsner, T. (2011). "DNA repair deficiency in neurodegeneration." Prog Neurobiol **94**(2): 166-200.
- Jessop, L. and Lichten, M. (2008). "Mus81/Mms4 endonuclease and Sgs1 helicase collaborate to ensure proper recombination intermediate metabolism during meiosis." Mol Cell **31**(3): 313-323.
- Jessop, L., Rockmill, B., Roeder, G. S. and Lichten, M. (2006). "Meiotic chromosome synapsis-promoting proteins antagonize the anti-crossover activity of sgs1." PLoS Genet **2**(9): e155.
- Jones, G. H. (1984). "The control of chiasma distribution." Symp Soc Exp Biol **38**: 293-320.
- Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2006). "Meiotic crossing-over: obligation and interference." Cell **126**(2): 246-248.
- Kagawa, W. and Kurumizaka, H. (2010). "From meiosis to postmeiotic events: uncovering the molecular roles of the meiosis-specific recombinase Dmc1." FEBS J **277**(3): 590-598.
- Kass, E. M. and Jasin, M. (2010). "Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways." FEBS Lett **584**(17): 3703-3708.
- Katagiri, T., Saito, H., Shinohara, A., Ogawa, H., Kamada, N., Nakamura, Y. and Miki, Y. (1998). "Multiple possible sites of BRCA2 interacting with DNA repair protein RAD51." Genes Chromosomes Cancer **21**(3): 217-222.
- Kee, Y. and D'Andrea, A. D. (2010). "Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability." Genes Dev **24**(16): 1680-1694.
- Keeney, S., Giroux, C. N. and Kleckner, N. (1997). "Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family." Cell **88**(3): 375-384.
- Kelly, K. O., Dernburg, A. F., Stanfield, G. M. and Villeneuve, A. M. (2000). "Caenorhabditis elegans msh-5 is required for both normal and radiation-induced meiotic crossing over but not for completion of meiosis." Genetics **156**(2): 617-630.
- Kersey, P. J., Lawson, D., Birney, E., Derwent, P. S., Haimel, M., Herrero, J., Keenan, S., Kerhornou, A., Koscielny, G., Kahari, A., Kinsella, R. J., Kulesha, E., Maheswari, U., Megy, K., Nuhn, M., Proctor, G., Staines, D., Valentin, F., Vilella, A. J. and Yates, A. (2010). "Ensembl Genomes: extending Ensembl across the taxonomic space." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D563-569.

- Kerzendorfer, C., Vignard, J., Pedrosa-Harand, A., Siwiec, T., Akimcheva, S., Jolivet, S., Sablowski, R., Armstrong, S., Schweizer, D., Mercier, R. and Schlogelhofer, P. (2006). "The Arabidopsis thaliana MND1 homologue plays a key role in meiotic homologous pairing, synapsis and recombination." *J Cell Sci* **119**(Pt 12): 2486-2496.
- Kirik, A., Salomon, S. and Puchta, H. (2000). "Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants." *EMBO J* **19**(20): 5562-5566.
- Kleckner, N. (2006). "Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex." *Chromosoma* **115**(3): 175-194.
- Kneitz, B., Cohen, P. E., Avdievich, E., Zhu, L., Kane, M. F., Hou, H., Jr., Kolodner, R. D., Kucherlapati, R., Pollard, J. W. and Edelman, W. (2000). "MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice." *Genes Dev* **14**(9): 1085-1097.
- Knoll, A. (2011). Rolle der DNA-Helikasen FANCM, SRS2 und RTEL1 in der somatischen und meiotischen homologen Rekombination von Arabidopsis thaliana. *Dissertation*. Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Knoll, A. and Puchta, H. (2011). "The role of DNA helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants." *J Exp Bot* **62**(5): 1565-1579.
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M. S., Klein, H., Ellenberger, T. and Sung, P. (2003). "DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament." *Nature* **423**(6937): 305-309.
- 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. and 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." *J Cell Biol* **176**(5): 581-592.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Larrea, A. A., Lujan, S. A. and Kunkel, T. A. (2010). "SnapShot: DNA mismatch repair." *Cell* **141**(4): 730 e731.
- Lavin, M. F. and Shiloh, Y. (1997). "The genetic defect in ataxia-telangiectasia." *Annu Rev Immunol* **15**: 177-202.
- Lhuissier, F. G., Offenberg, H. H., Wittich, P. E., Vischer, N. O. and Heyting, C. (2007). "The mismatch repair protein MLH1 marks a subset of strongly interfering crossovers in tomato." *Plant Cell* **19**(3): 862-876.
- Li, M. J. and Maizels, N. (1997). "Nuclear Rad51 foci induced by DNA damage are distinct from Rad51 foci associated with B cell activation and recombination." *Exp Cell Res* **237**(1): 93-100.
- Li, W., Chen, C., Markmann-Mulisch, U., Timofejeva, L., Schmelzer, E., Ma, H. and Reiss, B. (2004). "The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29): 10596-10601.
- Li, W., Yang, X., Lin, Z., Timofejeva, L., Xiao, R., Makaroff, C. A. and Ma, H. (2005). "The AtRAD51C gene is required for normal meiotic chromosome synapsis and double-stranded break repair in Arabidopsis." *Plant Physiol* **138**(2): 965-976.

- Li, X. and Heyer, W. D. (2008). "Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance." Cell Res **18**(1): 99-113.
- Lieber, M. R. (2010). "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway." Annu Rev Biochem **79**: 181-211.
- Liefshitz, B., Steinlauf, R., Friedl, A., Eckardt-Schupp, F. and Kupiec, M. (1998). "Genetic interactions between mutants of the 'error-prone' repair group of *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on recombination and mutagenesis." Mutat Res **407**(2): 135-145.
- Lim, D. S. and Hasty, P. (1996). "A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53." Mol Cell Biol **16**(12): 7133-7143.
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B. and Heyer, W. D. (2010a). "Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA." Nat Struct Mol Biol **17**(10): 1260-1262.
- Liu, J. and Heyer, W. D. (2011). "Who's who in human recombination: BRCA2 and RAD52." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 441-442.
- Liu, Y., Shete, S., Etzel, C. J., Scheurer, M., Alexiou, G., Armstrong, G., Tsavachidis, S., Liang, F. W., Gilbert, M., Aldape, K., Armstrong, T., Houlston, R., Hosking, F., Robertson, L., Xiao, Y., Wiencke, J., Wrensch, M., Andersson, U., Melin, B. S. and Bondy, M. (2010b). "Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMG2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival." J Clin Oncol **28**(14): 2467-2474.
- Lohmiller, L. D., De Muyt, A., Howard, B., Offenberg, H. H., Heyting, C., Grelon, M. and Anderson, L. K. (2008). "Cytological analysis of MRE11 protein during early meiotic prophase I in *Arabidopsis* and tomato." Chromosoma **117**(3): 277-288.
- Longhese, M. P., Bonetti, D., Manfrini, N. and Clerici, M. (2010). "Mechanisms and regulation of DNA end resection." EMBO J **29**(17): 2864-2874.
- Lynn, A., Soucek, R. and Borner, G. V. (2007). "ZMM proteins during meiosis: crossover artists at work." Chromosome Res **15**(5): 591-605.
- Ma, H. (2005). "Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants." Annu Rev Plant Biol **56**: 393-434.
- Macaisne, N., Novatchkova, M., Peirera, L., Vezon, D., Jolivet, S., Froger, N., Chelysheva, L., Grelon, M. and Mercier, R. (2008). "SHOC1, an XPF endonuclease-related protein, is essential for the formation of class I meiotic crossovers." Curr Biol **18**(18): 1432-1437.
- Macaisne, N., Vignard, J. and Mercier, R. (2011). "SHOC1 and PTD form an XPF-ERCC1-like complex that is required for formation of class I crossovers." J Cell Sci **124**(Pt 16): 2687-2691.
- Macris, M. A. and Sung, P. (2005). "Multifaceted role of the *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase in homologous recombination regulation." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1447-1450.
- Manfrini, N., Guerini, I., Citterio, A., Lucchini, G. and Longhese, M. P. (2010). "Processing of meiotic DNA double strand breaks requires cyclin-dependent kinase and multiple nucleases." J Biol Chem **285**(15): 11628-11637.
- Mankouri, H. W. and Hickson, I. D. (2007). "The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'?" Trends Biochem Sci **32**(12): 538-546.

- Mannuss, A., Dukowic-Schulze, S., Suer, S., Hartung, F., Pacher, M. and Puchta, H. (2010). "RAD5A, RECQ4A, and MUS81 have specific functions in homologous recombination and define different pathways of DNA repair in *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell **22**(10): 3318-3330.
- Marini, V. and Krejci, L. (2010). "Srs2: the "Odd-Job Man" in DNA repair." DNA Repair (Amst) **9**(3): 268-275.
- Marmorstein, L. Y., Ouchi, T. and Aaronson, S. A. (1998). "The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13869-13874.
- Marti, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S. and Garcia-Martinez, J. L. (2006). "Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom." J Exp Bot **57**(9): 2037-2047.
- Masson, J. Y., Davies, A. A., Hajibagheri, N., Van Dyck, E., Benson, F. E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. and West, S. C. (1999). "The meiosis-specific recombinase hDmc1 forms ring structures and interacts with hRad51." EMBO J **18**(22): 6552-6560.
- Masson, J. Y., Tarsounas, M. C., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, M. J., Benson, F. E. and West, S. C. (2001). "Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs." Genes Dev **15**(24): 3296-3307.
- Masson, J. Y. and West, S. C. (2001). "The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship." Trends Biochem Sci **26**(2): 131-136.
- Matsukura, C., Aoki, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Asamizu, E., Saito, T., Shibata, D. and Ezura, H. (2008). "Comprehensive resources for tomato functional genomics based on the miniature model tomato micro-tom." Curr Genomics **9**(7): 436-443.
- Mazina, O. M., Mazin, A. V., Nakagawa, T., Kolodner, R. D. and Kowalczykowski, S. C. (2004). "Saccharomyces cerevisiae Mer3 helicase stimulates 3'-5' heteroduplex extension by Rad51; implications for crossover control in meiotic recombination." Cell **117**(1): 47-56.
- McCormick, S. (1993). "Male Gametophyte Development." Plant Cell **5**(10): 1265-1275.
- McElver, J., Tzafirir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., Thomas, C., Schetter, A., Zhou, Q., Cushman, M. A., Tossberg, J., Nickle, T., Levin, J. Z., Law, M., Meinke, D. and Patton, D. (2001). "Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*." Genetics **159**(4): 1751-1763.
- Meetej, A. R., Medhurst, A. L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T. R., Bier, P., Steltenpool, J., Stone, S., Dokal, I., Mathew, C. G., Hoatlin, M., Joenje, H., de Winter, J. P. and Wang, W. (2005). "A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M." Nat Genet **37**(9): 958-963.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y. and Levy, A. (1997). "A new model system for tomato genetics." Plant Journal **12**(6): 1465-1472.
- Mercier, R., Armstrong, S. J., Horlow, C., Jackson, N. P., Makaroff, C. A., Vezon, D., Pelletier, G., Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2003). "The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis*." Development **130**(14): 3309-3318.
- Mercier, R. and Grelon, M. (2008). "Meiosis in plants: ten years of gene discovery." Cytogenet Genome Res **120**(3-4): 281-290.

- Mercier, R., Jolivet, S., Vezon, D., Huppe, E., Chelysheva, L., Giovanni, M., Nogue, F., Doutriaux, M. P., Horlow, C., Grelon, M. and Mezard, C. (2005). "Two meiotic crossover classes cohabit in Arabidopsis: one is dependent on MER3, whereas the other one is not." Curr Biol **15**(8): 692-701.
- Mimitou, E. P. and Symington, L. S. (2009). "DNA end resection: many nucleases make light work." DNA Repair (Amst) **8**(9): 983-995.
- Mizuta, R., LaSalle, J. M., Cheng, H. L., Shinohara, A., Ogawa, H., Copeland, N., Jenkins, N. A., Lalande, M. and Alt, F. W. (1997). "RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6927-6932.
- Moens, P. B., Kolas, N. K., Tarsounas, M., Marcon, E., Cohen, P. E. and Spyropoulos, B. (2002). "The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination." J Cell Sci **115**(Pt 8): 1611-1622.
- Moldovan, G. L. and D'Andrea, A. D. (2009). "How the fanconi anemia pathway guards the genome." Annu Rev Genet **43**: 223-249.
- Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffer, S. and Hohn, B. (2004). "Interchromatid and interhomolog recombination in Arabidopsis thaliana." Plant Cell **16**(2): 342-352.
- Morgan, T. H. (1915). "Localization of the Hereditary Material in the Germ Cells." Proc Natl Acad Sci U S A **1**(7): 420-429.
- Mortensen, U. H., Lisby, M. and Rothstein, R. (2009). "Rad52." Curr Biol **19**(16): R676-677.
- Moynahan, M. E., Pierce, A. J. and Jasin, M. (2001). "BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks." Mol Cell **7**(2): 263-272.
- Mueller, L. A., Lankhorst, R. K., Tanksley, S. D., Giovannoni, J. J., White, R., Vrebalov, J., Fei, Z., van Eck, J., Buels, R., Mills, A. A., Menda, N., Tecle, I. Y., Bombarely, A., Stack, S., Royer, S. M., Chang, S.-B., Shearer, L. A., Kim, B. D., Jo, S.-H., Hur, C.-G., Choi, D., Li, C.-B., Zhao, J., Jiang, H., Geng, Y., Dai, Y., Fan, H., Chen, J., Lu, F., Shi, J., Sun, S., Chen, J., Yang, X., Lu, C., Chen, M., Cheng, Z., Li, C., Ling, H., Xue, Y., Wang, Y., Seymour, G. B., Bishop, G. J., Bryan, G., Rogers, J., Sims, S., Butcher, S., Buchan, D., Abbott, J., Beasley, H., Nicholson, C., Riddle, C., Humphray, S., McLaren, K., Mathur, S., Vyas, S., Solanke, A. U., Kumar, R., Gupta, V., Sharma, A. K., Khurana, P., Khurana, J. P., Tyagi, A., Sarita, Chowdhury, P., Shridhar, S., Chattopadhyay, D., Pandit, A., Singh, P., Kumar, A., Dixit, R., Singh, A., Praveen, S., Dalal, V., Yadav, M., Ghazi, I. A., Gaikwad, K., Sharma, T. R., Mohapatra, T., Singh, N. K., Szinay, D., de Jong, H., Peters, S., van Staveren, M., Datema, E., Fiers, M. W. E. J., van Ham, R. C. H. J., Lindhout, P., Philippot, M., Frasse, P., Regad, F., Zouine, M., Bouzayen, M., Asamizu, E., Sato, S., Fukuoka, H., Tabata, S., Shibata, D., Botella, M. A., Perez-Alonso, M., Fernandez-Pedrosa, V., Osorio, S., Mico, A., Granell, A., Zhang, Z., He, J., Huang, S., Du, Y., Qu, D., Liu, L., Liu, D., Wang, J., Ye, Z., Yang, W., Wang, G., Vezzi, A., Todesco, S., Valle, G., Falcone, G., Pietrella, M., Giuliano, G., Grandillo, S., Traini, A., D'Agostino, N., Chiusano, M. L., Ercolano, M., Barone, A., Frusciante, L., Schoof, H., Jöcker, A., Bruggmann, R., Spannagl, M., Mayer, K. X. F., Guigó, R., Camara, F., Rombauts, S., Fawcett, J. A., Van de Peer, Y., Knapp, S., Zamir, D. and Stiekema, W. (2009). "A Snapshot of the Emerging Tomato Genome Sequence." Plant Gen. **2**(1): 78-92.

- Mueller, L. A., Solow, T. H., Taylor, N., Skwarecki, B., Buels, R., Binns, J., Lin, C., Wright, M. H., Ahrens, R., Wang, Y., Herbst, E. V., Keyder, E. R., Menda, N., Zamir, D. and Tanksley, S. D. (2005a). "The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond." Plant Physiol **138**(3): 1310-1317.
- Mueller, L. A., Tanksley, S. D., Giovannoni, J. J., van Eck, J., Stack, S., Choi, D., Kim, B. D., Chen, M., Cheng, Z., Li, C., Ling, H., Xue, Y., Seymour, G., Bishop, G., Bryan, G., Sharma, R., Khurana, J., Tyagi, A., Chattopadhyay, D., Singh, N. K., Stiekema, W., Lindhout, P., Jesse, T., Lankhorst, R. K., Bouzayen, M., Shibata, D., Tabata, S., Granell, A., Botella, M. A., Giuliano, G., Frusciante, L., Causse, M. and Zamir, D. (2005b). "The Tomato Sequencing Project, the first cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL)." Comp Funct Genomics **6**(3): 153-158.
- Muniandy, P. A., Liu, J., Majumdar, A., Liu, S. T. and Seidman, M. M. (2010). "DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step." Crit Rev Biochem Mol Biol **45**(1): 23-49.
- Nakagawa, T., Flores-Rozas, H. and Kolodner, R. D. (2001). "The MER3 helicase involved in meiotic crossing over is stimulated by single-stranded DNA-binding proteins and unwinds DNA in the 3' to 5' direction." J Biol Chem **276**(34): 31487-31493.
- Nakagawa, T. and Kolodner, R. D. (2002a). "The MER3 DNA helicase catalyzes the unwinding of holliday junctions." J Biol Chem **277**(31): 28019-28024.
- Nakagawa, T. and Kolodner, R. D. (2002b). "Saccharomyces cerevisiae Mer3 is a DNA helicase involved in meiotic crossing over." Mol Cell Biol **22**(10): 3281-3291.
- Nakagawa, T. and Ogawa, H. (1999). "The Saccharomyces cerevisiae MER3 gene, encoding a novel helicase-like protein, is required for crossover control in meiosis." EMBO J **18**(20): 5714-5723.
- Nasmyth, K. and Haering, C. H. (2005). "The structure and function of SMC and kleisin complexes." Annu Rev Biochem **74**: 595-648.
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W. R. and Gloor, G. B. (1994). "Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair." Mol Cell Biol **14**(3): 1613-1625.
- Neale, M. J., Pan, J. and Keeney, S. (2005). "Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks." Nature **436**(7053): 1053-1057.
- Negoescu, A., Labat-Moleur, F., Lorimier, P., Lamarcq, L., Guillermet, C., Chambaz, E. and Brambilla, E. (1994). "F(ab) secondary antibodies: a general method for double immunolabeling with primary antisera from the same species. Efficiency control by chemiluminescence." J Histochem Cytochem **42**(3): 433-437.
- Neyton, S., Lespinasse, F., Moens, P. B., Paul, R., Gaudray, P., Paquis-Flucklinger, V. and Santucci-Darmanin, S. (2004). "Association between MSH4 (MutS homologue 4) and the DNA strand-exchange RAD51 and DMC1 proteins during mammalian meiosis." Mol Hum Reprod **10**(12): 917-924.
- Niu, H., Chung, W. H., Zhu, Z., Kwon, Y., Zhao, W., Chi, P., Prakash, R., Seong, C., Liu, D., Lu, L., Ira, G. and Sung, P. (2010). "Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from Saccharomyces cerevisiae." Nature **467**(7311): 108-111.
- O'Donovan, P. J. and Livingston, D. M. (2010). "BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair." Carcinogenesis **31**(6): 961-967.
- Oh, S. D., Lao, J. P., Hwang, P. Y., Taylor, A. F., Smith, G. R. and Hunter, N. (2007). "BLM ortholog, Sgs1, prevents aberrant crossing-over by suppressing formation of multichromatid joint molecules." Cell **130**(2): 259-272.

- Oh, S. D., Lao, J. P., Taylor, A. F., Smith, G. R. and Hunter, N. (2008). "RecQ helicase, Sgs1, and XPF family endonuclease, Mus81-Mms4, resolve aberrant joint molecules during meiotic recombination." Mol Cell **31**(3): 324-336.
- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W. H. and Granell, A. (2006). "Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit." Plant Physiol **140**(1): 3-11.
- 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 Mol Biol **57**(6): 819-833.
- Osakabe, K., Yoshioka, T., Ichikawa, H. and Toki, S. (2002). "Molecular cloning and characterization of RAD51-like genes from Arabidopsis thaliana." Plant Mol Biol **50**(1): 71-81.
- Osman, K., Higgins, J. D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S. J. and Franklin, F. C. (2011). "Pathways to meiotic recombination in Arabidopsis thaliana." New Phytol **190**(3): 523-544.
- Osman, K., Sanchez-Moran, E., Higgins, J. D., Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2006). "Chromosome synapsis in Arabidopsis: analysis of the transverse filament protein ZYP1 reveals novel functions for the synaptonemal complex." Chromosoma **115**(3): 212-219.
- Osman, K., Sanchez-Moran, E., Mann, S. C., Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2009). "Replication protein A (AtRPA1a) is required for class I crossover formation but is dispensable for meiotic DNA break repair." EMBO J **28**(4): 394-404.
- Ostlund, G., Schmitt, T., Forslund, K., Kostler, T., Messina, D. N., Roopra, S., Frings, O. and Sonnhammer, E. L. (2010). "InParanoid 7: new algorithms and tools for eukaryotic orthology analysis." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D196-203.
- Page, S. L. and Hawley, R. S. (2004). "The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 525-558.
- Palom, Y., Suresh Kumar, G., Tang, L. Q., Paz, M. M., Musser, S. M., Rockwell, S. and Tomasz, M. (2002). "Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C." Chem Res Toxicol **15**(11): 1398-1406.
- Panico, E. R., Ede, C., Schildmann, M., Schurer, K. A. and Kramer, W. (2010). "Genetic evidence for a role of Saccharomyces cerevisiae Mph1 in recombinational DNA repair under replicative stress." Yeast **27**(1): 11-27.
- Panoli, A. P., Ravi, M., Sebastian, J., Nishal, B., Reddy, T. V., Marimuthu, M. P., Subbiah, V., Vijaybhaskar, V. and Siddiqi, I. (2006). "AtMND1 is required for homologous pairing during meiosis in Arabidopsis." BMC Mol Biol **7**: 24.
- Parfrey, L. W., Barbero, E., Lasser, E., Dunthorn, M., Bhattacharya, D., Patterson, D. J. and Katz, L. A. (2006). "Evaluating support for the current classification of eukaryotic diversity." PLoS Genet **2**(12): e220.
- Parfrey, L. W., Grant, J., Tekle, Y. I., Lasek-Nesselquist, E., Morrison, H. G., Sogin, M. L., Patterson, D. J. and Katz, L. A. (2010). "Broadly sampled multigene analyses yield a well-resolved eukaryotic tree of life." Syst Biol **59**(5): 518-533.
- Pascucci, B., D'Errico, M., Parlanti, E., Giovannini, S. and Dogliotti, E. (2011). "Role of nucleotide excision repair proteins in oxidative DNA damage repair: an updating." Biochemistry (Mosc) **76**(1): 4-15.

- Patel, K. J., Yu, V. P., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Colledge, W. H., Friedman, L. S., Ponder, B. A. and Venkitaraman, A. R. (1998). "Involvement of Brca2 in DNA repair." Mol Cell **1**(3): 347-357.
- Peterson, D. G., Pearson, W. R. and Stack, S. M. (1998). "Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using in vitro and in situ DNA reassociation." Genome **41**(3): 346-356.
- Petronczki, M., Siomos, M. F. and Nasmyth, K. (2003). "Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis." Cell **112**(4): 423-440.
- Pittman, D. L., Cobb, J., Schimenti, K. J., Wilson, L. A., Cooper, D. M., Brignull, E., Handel, M. A. and Schimenti, J. C. (1998). "Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog." Mol Cell **1**(5): 697-705.
- Polosina, Y. Y. and Cupples, C. G. (2010). "Wot the 'L-Does MutL do?" Mutat Res **705**(3): 228-238.
- Pommier, Y. (2009). "DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition." Chem Rev **109**(7): 2894-2902.
- Prakash, R., Krejci, L., Van Komen, S., Anke Schurer, K., Kramer, W. and Sung, P. (2005). "Saccharomyces cerevisiae MPH1 gene, required for homologous recombination-mediated mutation avoidance, encodes a 3' to 5' DNA helicase." J Biol Chem **280**(9): 7854-7860.
- Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., Krejci, L., Klein, H., Haber, J. E., Sung, P. and Ira, G. (2009). "Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination." Genes Dev **23**(1): 67-79.
- Proost, S., Van Bel, M., Sterck, L., Billiau, K., Van Parys, T., Van de Peer, Y. and Vandepoele, K. (2009). "PLAZA: a comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants." Plant Cell **21**(12): 3718-3731.
- Puchta, H. (1999). "Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells." Genetics **152**(3): 1173-1181.
- Puchta, H. (2005). "The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution." J Exp Bot **56**(409): 1-14.
- Puizina, J., Siroky, J., Mokros, P., Schweizer, D. and Riha, K. (2004). "Mre11 deficiency in Arabidopsis is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis." Plant Cell **16**(8): 1968-1978.
- Qiao, H., Lohmiller, L. D. and Anderson, L. K. (2011). "Cohesin proteins load sequentially during prophase I in tomato primary microsporocytes." Chromosome Res **19**(2): 193-207.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R. and Lopez, R. (2005). "InterProScan: protein domains identifier." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W116-120.
- Raderschall, E., Bazarov, A., Cao, J., Lurz, R., Smith, A., Mann, W., Ropers, H. H., Sedivy, J. M., Golub, E. I., Fritz, E. and Haaf, T. (2002a). "Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis." J Cell Sci **115**(Pt 1): 153-164.
- Raderschall, E., Stout, K., Freier, S., Suckow, V., Schweiger, S. and Haaf, T. (2002b). "Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells." Cancer Res **62**(1): 219-225.
- Rass, U., Ahel, I. and West, S. C. (2007). "Defective DNA repair and neurodegenerative disease." Cell **130**(6): 991-1004.

- Raynard, S., Bussen, W. and Sung, P. (2006). "A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75." J Biol Chem **281**(20): 13861-13864.
- Raynard, S., Zhao, W., Bussen, W., Lu, L., Ding, Y. Y., Busygina, V., Meetei, A. R. and Sung, P. (2008). "Functional role of BLAP75 in BLM-topoisomerase IIIalpha-dependent holliday junction processing." J Biol Chem **283**(23): 15701-15708.
- Reardon, J. T. and Sancar, A. (2005). "Nucleotide excision repair." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **79**: 183-235.
- Reina-San-Martin, B., Chen, H. T., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M. C. (2004). "ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions." J Exp Med **200**(9): 1103-1110.
- Rezazadeh, S. (2011). "RecQ helicases; at the crossroad of genome replication, repair, and recombination." Mol Biol Rep.
- Richmond, M. L. (2006). "The 1909 Darwin celebration. Reexamining evolution in the light of Mendel, mutation, and meiosis." Isis **97**(3): 447-484.
- Roberts, N. Y., Osman, K. and Armstrong, S. J. (2009). "Telomere distribution and dynamics in somatic and meiotic nuclei of Arabidopsis thaliana." Cytogenet Genome Res **124**(3-4): 193-201.
- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T. and Leiros, I. (2009). "DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it." Cell Mol Life Sci **66**(6): 981-993.
- Rockmill, B., Fung, J. C., Branda, S. S. and Roeder, G. S. (2003). "The Sgs1 helicase regulates chromosome synapsis and meiotic crossing over." Curr Biol **13**(22): 1954-1962.
- Rockmill, B., Sym, M., Scherthan, H. and Roeder, G. S. (1995). "Roles for two RecA homologs in promoting meiotic chromosome synapsis." Genes Dev **9**(21): 2684-2695.
- Ross-Macdonald, P. and Roeder, G. S. (1994). "Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction." Cell **79**(6): 1069-1080.
- Ross, K. J., Fransz, P., Armstrong, S. J., Vizir, I., Mulligan, B., Franklin, F. C. and Jones, G. H. (1997). "Cytological characterization of four meiotic mutants of Arabidopsis isolated from T-DNA-transformed lines." Chromosome Res **5**(8): 551-559.
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. and Weisshaar, B. (2003). "An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics." Plant Mol Biol **53**(1-2): 247-259.
- Saito, T., Ariizumi, T., Okabe, Y., Asamizu, E., Hiwasa-Tanase, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Yamazaki, Y., Aoki, K. and Ezura, H. (2011). "TOMATOMA: a novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections." Plant Cell Physiol **52**(2): 283-296.
- Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A. and Warner, T. T. (2008). "Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms." Lancet Neurol **7**(12): 1127-1138.
- Salomon, S. and Puchta, H. (1998). "Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells." EMBO J **17**(20): 6086-6095.
- San Filippo, J., Sung, P. and Klein, H. (2008). "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." Annu Rev Biochem **77**: 229-257.
- Sanchez-Moran, E., Armstrong, S. J., Santos, J. L., Franklin, F. C. and Jones, G. H. (2001). "Chiasma formation in Arabidopsis thaliana accession Wassileskija and in two meiotic mutants." Chromosome Res **9**(2): 121-128.
- Sanchez-Moran, E., Osman, K., Higgins, J. D., Pradillo, M., Cunado, N., Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2008). "ASY1 coordinates early events in the plant meiotic recombination pathway." Cytogenet Genome Res **120**(3-4): 302-312.

- Sanchez-Moran, E., Santos, J. L., Jones, G. H. and Franklin, F. C. (2007). "ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis." Genes Dev **21**(17): 2220-2233.
- Scheller, J., Schurer, A., Rudolph, C., Hettwer, S. and Kramer, W. (2000). "MPH1, a yeast gene encoding a DEAH protein, plays a role in protection of the genome from spontaneous and chemically induced damage." Genetics **155**(3): 1069-1081.
- Schneitz, K. (1999). "The molecular and genetic control of ovule development." Curr Opin Plant Biol **2**(1): 13-17.
- Schneitz, K., Baker, S. C., Gasser, C. S. and Redweik, A. (1998). "Pattern formation and growth during floral organogenesis: HUELLENLOS and AINTEGUMENTA are required for the formation of the proximal region of the ovule primordium in Arabidopsis thaliana." Development **125**(14): 2555-2563.
- Schneitz, K., Hulskamp, M., Kopczak, S. D. and Pruitt, R. E. (1997). "Dissection of sexual organ ontogenesis: a genetic analysis of ovule development in Arabidopsis thaliana." Development **124**(7): 1367-1376.
- Schubert, V. (2009). "SMC proteins and their multiple functions in higher plants." Cytogenet Genome Res **124**(3-4): 202-214.
- Schüle, R., Schlipf, N., Synofzik, M., Klebe, S., Klimpe, S., Hehr, U., Winner, B., Lindig, T., Dotzer, A., Riess, O., Winkler, J., Schöls, L. and Bauer, P. (2009). "Frequency and phenotype of SPG11 and SPG15 in complicated hereditary spastic paraplegia." J Neurol Neurosurg Psychiatry **80**(12): 1402-1404.
- Schürer, K. A., Rudolph, C., Ulrich, H. D. and Kramer, W. (2004). "Yeast MPH1 gene functions in an error-free DNA damage bypass pathway that requires genes from Homologous recombination, but not from postreplicative repair." Genetics **166**(4): 1673-1686.
- Schwacha, A. and Kleckner, N. (1997). "Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway." Cell **90**(6): 1123-1135.
- Scott, J. W. and Harbaugh, B. K. (1989). "MicroTom - a miniature dwarf tomato." Florida Agr Expt Sta Circ **370**: 1-6.
- Seeliger, K., Dukowic-Schulze, S., Wurz-Wildersinn, R., Pacher, M. and Puchta, H. (2011). "BRCA2 is a mediator of RAD51- and DMC1-facilitated homologous recombination in Arabidopsis thaliana." New Phytol **accepted for publication**.
- Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P. and Bradley, A. (1997). "Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2." Nature **386**(6627): 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. and Handel, M. A. (2004). "BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility." Development **131**(1): 131-142.
- Sherman, J. D. and 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**(2): 683-708.

- Shete, S., Hosking, F. J., Robertson, L. B., Dobbins, S. E., Sanson, M., Malmer, B., Simon, M., Marie, Y., Boisselier, B., Delattre, J. Y., Hoang-Xuan, K., El Hallani, S., Idbaih, A., Zelenika, D., Andersson, U., Henriksson, R., Bergenheim, A. T., Feychting, M., Lonn, S., Ahlbom, A., Schramm, J., Linnebank, M., Hemminki, K., Kumar, R., Hepworth, S. J., Price, A., Armstrong, G., Liu, Y., Gu, X., Yu, R., Lau, C., Schoemaker, M., Muir, K., Swerdlow, A., Lathrop, M., Bondy, M. and Houlston, R. S. (2009). "Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma." Nat Genet **41**(8): 899-904.
- Shiloh, Y. (1997). "Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart." Annu Rev Genet **31**: 635-662.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-168.
- Shinohara, A. and Shinohara, M. (2004). "Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination." Cytogenet Genome Res **107**(3-4): 201-207.
- Shinohara, M., Oh, S. D., Hunter, N. and Shinohara, A. (2008). "Crossover assurance and crossover interference are distinctly regulated by the ZMM proteins during yeast meiosis." Nat Genet **40**(3): 299-309.
- Siaud, N., Dray, E., Gy, I., Gerard, E., Takvorian, N. and Doutriaux, M. P. (2004). "Brca2 is involved in meiosis in Arabidopsis thaliana as suggested by its interaction with Dmc1." Embo J **23**(6): 1392-1401.
- Siebert, R. and Puchta, H. (2002). "Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome." Plant Cell **14**(5): 1121-1131.
- Singh, T. R., Ali, A. M., Busygina, V., Raynard, S., Fan, Q., Du, C. H., Andreassen, P. R., Sung, P. and Meetei, A. R. (2008). "BLAP18/RMI2, a novel OB-fold-containing protein, is an essential component of the Bloom helicase-double Holliday junction dissolvasome." Genes Dev **22**(20): 2856-2868.
- Skinner, D. J., Hill, T. A. and Gasser, C. S. (2004). "Regulation of ovule development." Plant Cell **16** Suppl: S32-45.
- Slabicki, M., Theis, M., Krastev, D. B., Samsonov, S., Mundwiler, E., Junqueira, M., Paszkowski-Rogacz, M., Teyra, J., Heninger, A. K., Poser, I., Prieur, F., Truchetto, J., Confavreux, C., Marelli, C., Durr, A., Camdessanche, J. P., Brice, A., Shevchenko, A., Pisabarro, M. T., Stevanin, G. and Buchholz, F. (2010). "A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia." PLoS Biol **8**(6): e1000408.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. and Meyerowitz, E. M. (1990). "Early flower development in Arabidopsis." Plant Cell **2**(8): 755-767.
- Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M. and Fishel, R. (2004). "hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes." Mol Cell **15**(3): 437-451.
- Stacey, N. J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., Maxwell, A., Roberts, K. and Sugimoto-Shirasu, K. (2006). "Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination." Plant J **48**(2): 206-216.
- Stack, S. and Anderson, L. (1986). "Two-dimensional spreads of synaptonemal complexes from solanaceous plants." Chromosoma **94**(4): 253-258.

- Stevanin, G., Santorelli, F. M., Azzedine, H., Coutinho, P., Chomilier, J., Denora, P. S., Martin, E., Ouvrard-Hernandez, A. M., Tessa, A., Bouslam, N., Lossos, A., Charles, P., Loureiro, J. L., Elleuch, N., Confavreux, C., Cruz, V. T., Ruberg, M., Leguern, E., Grid, D., Tazir, M., Fontaine, B., Filla, A., Bertini, E., Durr, A. and Brice, A. (2007). "Mutations in SPG11, encoding spatascin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum." *Nat Genet* **39**(3): 366-372.
- Storlazzi, A., Xu, L., Schwacha, A. and Kleckner, N. (1996). "Synaptonemal complex (SC) component Zip1 plays a role in meiotic recombination independent of SC polymerization along the chromosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(17): 9043-9048.
- Stronghill, P., Pathan, N., Ha, H., Supijono, E. and Hasenkampf, C. (2010). "Ahp2 (Hop2) function in *Arabidopsis thaliana* (Ler) is required for stabilization of close alignment and synaptonemal complex formation except for the two short arms that contain nucleolus organizer regions." *Chromosoma* **119**(4): 443-458.
- Su, X. and Huang, J. (2011). "The Fanconi anemia pathway and DNA interstrand cross-link repair." *Protein Cell* **2**(9): 704-711.
- Sugiyama, T., Kantake, N., Wu, Y. and Kowalczykowski, S. C. (2006). "Rad52-mediated DNA annealing after Rad51-mediated DNA strand exchange promotes second ssDNA capture." *EMBO J* **25**(23): 5539-5548.
- Sugiyama, T., Zaitseva, E. M. and Kowalczykowski, S. C. (1997). "A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein." *J Biol Chem* **272**(12): 7940-7945.
- Sun, H. J., Uchii, S., Watanabe, S. and Ezura, H. (2006). "A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics." *Plant Cell Physiol* **47**(3): 426-431.
- Sung, P. (1994). "Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein." *Science* **265**(5176): 1241-1243.
- 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. and Mak, T. W. (1997). "Brca2 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse." *Genes Dev* **11**(10): 1242-1252.
- Sym, M., Engebrecht, J. A. and Roeder, G. S. (1993). "ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis." *Cell* **72**(3): 365-378.
- Symington, L. S. (2002). "Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair." *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(4): 630-670, table of contents.
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. and Stahl, F. W. (1983). "The double-strand-break repair model for recombination." *Cell* **33**(1): 25-35.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." *Mol Biol Evol* **28**(10): 2731-2739.
- Tanaka, K., Miyamoto, N., Shouguchi-Miyata, J. and Ikeda, J. E. (2006). "HFM1, the human homologue of yeast Mer3, encodes a putative DNA helicase expressed specifically in germ-line cells." *DNA Seg* **17**(3): 242-246.
- Tarsounas, M., Davies, A. A. and West, S. C. (2004). "RAD51 localization and activation following DNA damage." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**(1441): 87-93.
- Tarsounas, M., Davies, D. and West, S. C. (2003). "BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci." *Oncogene* **22**(8): 1115-1123.

- Thorslund, T., Esashi, F. and West, S. C. (2007). "Interactions between human BRCA2 protein and the meiosis-specific recombinase DMC1." EMBO J **26**(12): 2915-2922.
- Thorslund, T., McIlwraith, M. J., Compton, S. A., Lekomtsev, S., Petronczki, M., Griffith, J. D. and West, S. C. (2010). "The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA." Nat Struct Mol Biol **17**(10): 1263-1265.
- Thorslund, T. and West, S. C. (2007). "BRCA2: a universal recombinase regulator." Oncogene **26**(56): 7720-7730.
- Trapp, O., Seeliger, K. and Puchta, H. (2011). "Homologs of breast cancer genes in plants." Front. Plant Sci. **2**(19): doi: 10.3389/fpls.2011.00019
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y. and Morita T (1996). "Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6236-6240.
- Tuteja, N., Ahmad, P., Panda, B. B. and Tuteja, R. (2009). "Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases." Mutat Res **681**(2-3): 134-149.
- Tutt, A., Bertwistle, D., Valentine, J., Gabriel, A., Swift, S., Ross, G., Griffin, C., Thacker, J. and Ashworth, A. (2001). "Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences." EMBO J **20**(17): 4704-4716.
- Uanschou, C., Siwiec, T., Pedrosa-Harand, A., Kerzendorfer, C., Sanchez-Moran, E., Novatchkova, M., Akimcheva, S., Woglar, A., Klein, F. and Schlogelhofer, P. (2007). "A novel plant gene essential for meiosis is related to the human CtIP and the yeast COM1/SAE2 gene." EMBO J **26**(24): 5061-5070.
- Uringa, E. J., Youds, J. L., Lisaingo, K., Lansdorp, P. M. and Boulton, S. J. (2011). "RTEL1: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination." Nucleic Acids Res **39**(5): 1647-1655.
- Van der Hoeven, R., Ronning, C., Giovannoni, J., Martin, G. and Tanksley, S. (2002). "Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing." Plant Cell **14**(7): 1441-1456.
- van Veelen, L. R., Essers, J., van de Rakt, M. W., Odijk, H., Pastink, A., Zdzienicka, M. Z., Paulusma, C. C. and Kanaar, R. (2005). "Ionizing radiation-induced foci formation of mammalian Rad51 and Rad54 depends on the Rad51 paralogs, but not on Rad52." Mutat Res **574**(1-2): 34-49.
- Ventura, S. and Villaverde, A. (2006). "Protein quality in bacterial inclusion bodies." Trends Biotechnol **24**(4): 179-185.
- Vignard, J., Siwiec, T., Chelysheva, L., Vrielynck, N., Gonord, F., Armstrong, S. J., Schlogelhofer, P. and Mercier, R. (2007). "The interplay of RecA-related proteins and the MND1-HOP2 complex during meiosis in *Arabidopsis thaliana*." PLoS Genet **3**(10): 1894-1906.
- Vindigni, A. and Hickson, I. D. (2009). "RecQ helicases: multiple structures for multiple functions?" HFSP J **3**(3): 153-164.
- Wang, K., Tang, D., Wang, M., Lu, J., Yu, H., Liu, J., Qian, B., Gong, Z., Wang, X., Chen, J., Gu, M. and Cheng, Z. (2009). "MER3 is required for normal meiotic crossover formation, but not for presynaptic alignment in rice." J Cell Sci **122**(Pt 12): 2055-2063.

- Wang, S., Durrant, W. E., Song, J., Spivey, N. W. and Dong, X. (2010). "Arabidopsis BRCA2 and RAD51 proteins are specifically involved in defense gene transcription during plant immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(52): 22716-22721.
- Wang, T. F. and Kung, W. M. (2002). "Supercomplex formation between Mlh1-Mlh3 and Sgs1-Top3 heterocomplexes in meiotic yeast cells." Biochem Biophys Res Commun **296**(4): 949-953.
- Waters, L. S., Minesinger, B. K., Wiltrout, M. E., D'Souza, S., Woodruff, R. V. and Walker, G. C. (2009). "Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance." Microbiol Mol Biol Rev **73**(1): 134-154.
- Waterworth, W. M., Altun, C., Armstrong, S. J., Roberts, N., Dean, P. J., Young, K., Weil, C. F., Bray, C. M. and West, C. E. (2007). "NBS1 is involved in DNA repair and plays a synergistic role with ATM in mediating meiotic homologous recombination in plants." Plant J **52**(1): 41-52.
- Whitby, M. C. (2010). "The FANCM family of DNA helicases/translocases." DNA Repair (Amst) **9**(3): 224-236.
- Wijeratne, A. J., Chen, C., Zhang, W., Timofejeva, L. and Ma, H. (2006). "The Arabidopsis thaliana PARTING DANCERS gene encoding a novel protein is required for normal meiotic homologous recombination." Mol Biol Cell **17**(3): 1331-1343.
- Wilson, Z. A. and Yang, C. (2004). "Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development." Reproduction **128**(5): 483-492.
- Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V. and Bartel, P. L. (1997). "RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2." J Biol Chem **272**(51): 31941-31944.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. and Micklem, G. (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." Nature **378**(6559): 789-792.
- Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D. and et al. (1994). "Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13." Science **265**(5181): 2088-2090.
- Wrensch, M., Jenkins, R. B., Chang, J. S., Yeh, R. F., Xiao, Y., Decker, P. A., Ballman, K. V., Berger, M., Buckner, J. C., Chang, S., Giannini, C., Halder, C., Kollmeyer, T. M., Kosel, M. L., LaChance, D. H., McCoy, L., O'Neill, B. P., Patoka, J., Pico, A. R., Prados, M., Quesenberry, C., Rice, T., Rynearson, A. L., Smirnov, I., Tihan, T., Wiemels, J., Yang, P. and Wiencke, J. K. (2009). "Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility." Nat Genet **41**(8): 905-908.
- Wu, F. and Tanksley, S. D. (2010). "Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae." BMC Genomics **11**: 182.
- Xu, D., Guo, R., Sobeck, A., Bachrati, C. Z., Yang, J., Enomoto, T., Brown, G. W., Hoatlin, M. E., Hickson, I. D. and Wang, W. (2008). "RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability." Genes Dev **22**(20): 2843-2855.
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E. E., Bronson, R. T., Meyn, M. S. and Baltimore, D. (1996). "Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma." Genes Dev **10**(19): 2411-2422.
- Yarbro, J. W. (1992). "Mechanism of action of hydroxyurea." Semin Oncol **19**(3 Suppl 9): 1-10.

- Yoon, H. S., Grant, J., Tekle, Y. I., Wu, M., Chaon, B. C., Cole, J. C., Logsdon, J. M., Jr., Patterson, D. J., Bhattacharya, D. and Katz, L. A. (2008). "Broadly sampled multigene trees of eukaryotes." *BMC Evol Biol* **8**: 14.
- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y. and Morita, T. (1998). "The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis." *Mol Cell* **1**(5): 707-718.
- Yoshida, K. and Miki, Y. (2004). "Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage." *Cancer Sci* **95**(11): 866-871.
- Youds, J. L. and Boulton, S. J. (2011). "The choice in meiosis - defining the factors that influence crossover or non-crossover formation." *J Cell Sci* **124**(Pt 4): 501-513.
- Youds, J. L., Mets, D. G., McIlwraith, M. J., Martin, J. S., Ward, J. D., NJ, O. N., Rose, A. M., West, S. C., Meyer, B. J. and Boulton, S. J. (2010). "RTEL-1 enforces meiotic crossover interference and homeostasis." *Science* **327**(5970): 1254-1258.
- Yu, V. P., Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L. A., van Gool, A. J., West, S. C. and Venkitaraman, A. R. (2000). "Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation." *Genes Dev* **14**(11): 1400-1406.
- Yuan, S. S., Lee, S. Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G. E. and Lee, E. Y. (1999). "BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo." *Cancer Res* **59**(15): 3547-3551.
- Zalevsky, J., MacQueen, A. J., Duffy, J. B., Kempfues, K. J. and Villeneuve, A. M. (1999). "Crossing over during *Caenorhabditis elegans* meiosis requires a conserved MutS-based pathway that is partially dispensable in budding yeast." *Genetics* **153**(3): 1271-1283.
- Zdobnov, E. M. and Apweiler, R. (2001). "InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro." *Bioinformatics* **17**(9): 847-848.

9. Anhang

PRIMERTABELLEN UND SCREENING VON PFLANZENLINIEN

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer, Teil I. Angegeben sind der Name des Primers, die Sequenz in 5' nach 3'-Richtung und der jeweilige Verwendungszweck.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendungszweck
GABI LB	TTGGACGTGAATGTAGACAC	Screening <i>Left Border</i>
LB1	GACCATCATACTCATTGCTG	Screening <i>Left Border</i>
LBd1	TCGGAACCACCATCAAACAG	Screening <i>Left Border</i>
LB3syn	TTCATAACCAATCTCGATACAC	Screening <i>Left Border</i>
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	Screening <i>Left Border</i>
IC9C-FW neu	GAAGAACCTACCTGGTCTGT	Screening IC9C
IC9C-RV	CCAGAAGTAAAAGTGAAGTTC	Screening IC9C
BRCA2 C4 2466 FW long	GTGATTGTCACCTCTATTAGATAGACAGTGAGTA	Screening <i>brca2</i>
BRCA2 3363 RV	TCGGTCCGCCAGTGAGC	Screening <i>brca2</i>
RAD51-FW	AGCTCCATGCTCAGAGAC	Screening <i>rad51-1</i>
RAD51-RV	CAGATGATTCCGTCTCAAG	Screening <i>rad51-1</i>
DMC1 c	AGGTACTCTGTCTCTCAATG	Screening <i>dmc1-1</i>
DMC1-R2	GTTAGTCATGTAGACAGCAAC	Screening <i>dmc1-1</i>
MSH4-F1	CGCTTGGTTTAGACACTTAC	Screening <i>msh4-1</i>
MSH4-R1	CGTTGTGGAAATGGATCAATG	Screening <i>msh4-1</i>
T3A-3-1	CATTACCTAGCATGTGTTTC	Screening <i>top3α-2</i>
T3A-R3A	GAAAACCGTGTATTAGCATC	Screening <i>top3α-2</i>
RM1-IN1-FW	AACCGGAAACCTCAGTATC	Screening <i>rmi1-1</i>
RMI1-IN1-RV	AACAAACGGACCAGCGAG	Screening <i>rmi1-1</i>
RMI1-IN2-RV	AGAAGCTCATACGTAGACTG	Screening <i>rmi1-1</i>
RTEL1-IN5-FW2	AGGGACTATGTTGTTTCAC	Screening <i>rtel1-1</i>
RTEL1-IN7-RW2	GGACGAATGAGATGGTGTA	Screening <i>rtel1-1</i>
MPH1-1	GGATCTAGGGTTCCAATAG	Screening <i>fancm-1</i>
MPH1-R1	CCTCAATCTGCTGCATCAC	Screening <i>fancm-1</i>

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer, Teil II. Angegeben sind der Name des Primers, die Sequenz in 5' nach 3'-Richtung und der jeweilige Verwendungszweck.

Primername	Sequenz (5'->3')	Verwendungszweck
SPG48-FW1	TTTACAGCCTTCCTAGTTTGT	Screening <i>spg48-1</i>
SPG48-RV1	GATTCTTGCCCTCAAACCTAG	Screening <i>spg48-1</i>
SPG48-ATG-FW	ATGAGTGATCAAGAAGGAGAC	Expressionsanalyse <i>spg48-1</i>
SPG48-RV4	TCCCAATTCCAGGCAATGA	Expressionsanalyse <i>spg48-1</i>
SPG48-FW3	TGATCTGTGCTTTAATCCCT	Expressionsanalyse <i>spg48-1</i>
SPG48-FW4	GAATGGTTCAAGAAGAACAAC	Expressionsanalyse <i>spg48-1</i>
SPG48-Stopp-RV	TTAGTTTTTGGGGATGATATC	Expressionsanalyse <i>spg48-1</i>
β-TUBULIN FW	CCTGATAACTTCGTCTTTGG	Kontrolle cDNA
β-TUBULIN RV	GTCAACTCCATCTCGTCCAT	Kontrolle cDNA
RTEL1-1922fw	GTAAGGTCAGCGAAGGAC	Klonierung RTEL1-C
RTEL1-Stopp-RV	TTAATTTGAGTTACCAAAGATGA	Klonierung RTEL1-C

Tabelle 8: Screening der in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien. Angegeben sind der Name der Linie, die verwendete Primerkombination, die ungefähre Produktgröße und die Annealingtemperatur ($T_{\text{Annealing}}$).

Linie	Primerkombination	ungefähre Produktgröße	$T_{\text{Annealing}}$
IC9C	IC9C-FW neu / IC9C-RV	750 bp	56 °C
	LB1 / IC9C-FW neu	850 bp	56 °C
<i>brca2</i>	BRCA2 C4 2466 FW long / BRCA2 3363 RV	950 bp	56 °C
	GABI LB / BRCA2 C4 FW long	1000 bp	56 °C
<i>rad51-1</i>	RAD51-FW / RAD51-RV	850 bp	56 °C
	LB1 / RAD51-FW	250 bp	56 °C
<i>dmc1-1</i>	DMC1 c / DMC1 R2	800 bp	58 °C
	LB3syn / DMC1 R2	700 bp	58 °C
<i>msh4-1</i>	MSH4-F1 / MSH4-R1	600 bp	56 °C
	LBd1 / MSH4-R1	650 bp	56 °C
<i>top3a-2</i>	T3A-3-1 / T3A-R3A	1200 bp	56 °C
	LB1 / T3A-R3A	800 bp	56 °C
<i>rmi1-1</i>	RMI1-IN1-FW / RMI1-IN1-RV	400 bp	56 °C
	RMI1-IN1-FW / RMI1-IN2-RV	600 bp	56 °C
<i>rtel1-1</i>	RTEL1-IN5-FW2 / RTEL1-IN7-RW2	700 bp	56 °C
	LBd1 / RTEL1-IN5-FW2	750 bp	56 °C
<i>fancm-1</i>	MPH1-1 / MPH1-R1	700 bp	56 °C
	LBd1 / MPH1-1	600 bp	56 °C
<i>spg48-1</i>	SPG48-FW1 / SPG48-RV1	1000 bp	56 °C
	LBb1.3 / SPG48-RV1	700 bp	56 °C

UNTERSUCHUNGEN ZU AtSPG48

Tabelle 9: Semiquantitative Expressionsanalyse von *spg48-1*. Angegeben sind der zu amplifizierende Bereich (Nummerierung entsprechend Abbildung 13), die verwendete Primerkombination, die ungefähre Produktgröße und die Annealingtemperatur ($T_{\text{Annealing}}$).

Bereich	Primerkombination	ungefähre Produktgröße	$T_{\text{Annealing}}$
cDNA Kontrolle	β -tubulin FW / β -tubulin RV	1000 bp	54 °C
1	SPG48-ATG-FW / SPG48-RV4	500 bp	56 °C
2	SPG48-FW3 / SPG48-RV1	350 bp	56 °C
3	SPG48-FW4 / SPG48-Stopp-RV	400 bp	56 °C

Tabelle 10: Untersuchungen von *spg48-1* auf Hypersensitivität gegenüber Genotoxinen. Aufgeführt sind die Ergebnisse der einzelnen Assays jeweils bezogen auf das Frischgewicht der unbehandelten Linie, sowie der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (StabW). Alle Assays wurden in je mindestens drei biologischen Replikaten durchgeführt (WT = Wildtyp; Konz = Konzentration).

Genotoxin	Linie	Konz	relatives Frischgewicht in %				MW	StabW
Bleomycin	WT	2 $\mu\text{g/ml}$	42,81	19,92	25,98	40,39	32,28	11,09
		5 $\mu\text{g/ml}$	30,27	12,05	19,14	30,11	22,89	8,91
	<i>spg48(1)</i>	2 $\mu\text{g/ml}$	42,54	36,64	32,13	46,33	39,41	6,28
		5 $\mu\text{g/ml}$	30,00	29,21	20,63	29,98	27,46	4,56
MMC	WT	10 $\mu\text{g/ml}$	62,70	66,87	49,99	42,25	55,45	11,36
		20 $\mu\text{g/ml}$	25,00	24,95	28,90	15,68	23,63	5,62
	<i>spg48(1)</i>	10 $\mu\text{g/ml}$	57,57	58,89	62,00	41,85	55,08	9,01
		20 $\mu\text{g/ml}$	29,62	28,71	32,87	20,28	27,87	5,37
Cisplatin	WT	5 μM	97,33	97,79	90,81		95,31	3,90
		10 μM	77,59	75,49	72,57		75,22	2,52
	<i>spg48(1)</i>	5 μM	93,26	99,98	94,87		96,03	3,51
		10 μM	77,98	76,78	77,09		77,28	0,62
MMS	WT	75 ppm	58,63	42,01	59,13		53,26	9,74
		100 ppm	26,12	14,71	34,00		24,94	9,70
	<i>spg48(1)</i>	75 ppm	53,99	53,22	54,46		53,89	0,63
		100 ppm	26,90	17,40	25,76		23,35	5,19
HU	WT	2 mM	34,40	25,81	20,87		27,03	6,84
		4 mM	12,83	11,17	8,95		10,98	1,95
	<i>spg48(1)</i>	2 mM	24,48	18,07	13,38		18,64	5,57
		4 mM	10,35	7,17	8,32		8,61	1,61
CPT	WT	150 nM	69,69	85,46	75,74		76,96	7,96
		300 nM	60,04	59,45	63,51		61,00	2,19
	<i>spg48(1)</i>	150 nM	69,18	92,84	75,64		79,22	12,23
		300 nM	49,95	63,41	60,93		58,10	7,16

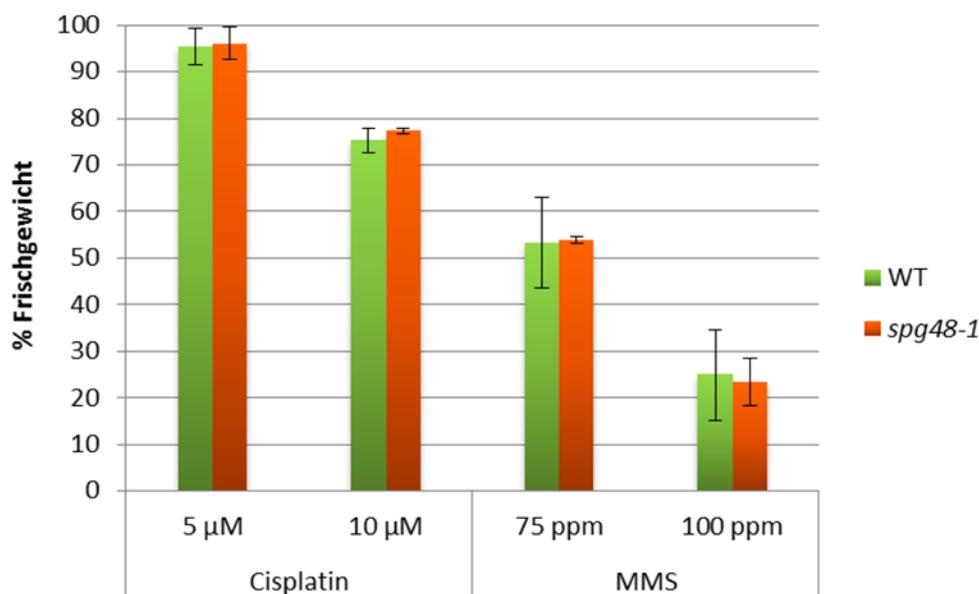


Abbildung 33: Untersuchung von *spg48-1* auf Hypersensitivität gegenüber Cisplatin und MMS. Die Mutante zeigt keine vom Wildtyp abweichende Sensitivität gegenüber den getesteten Genotoxinen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten mit Standardabweichungen (WT = Wildtyp; MMS = Methylmethansulfonat).

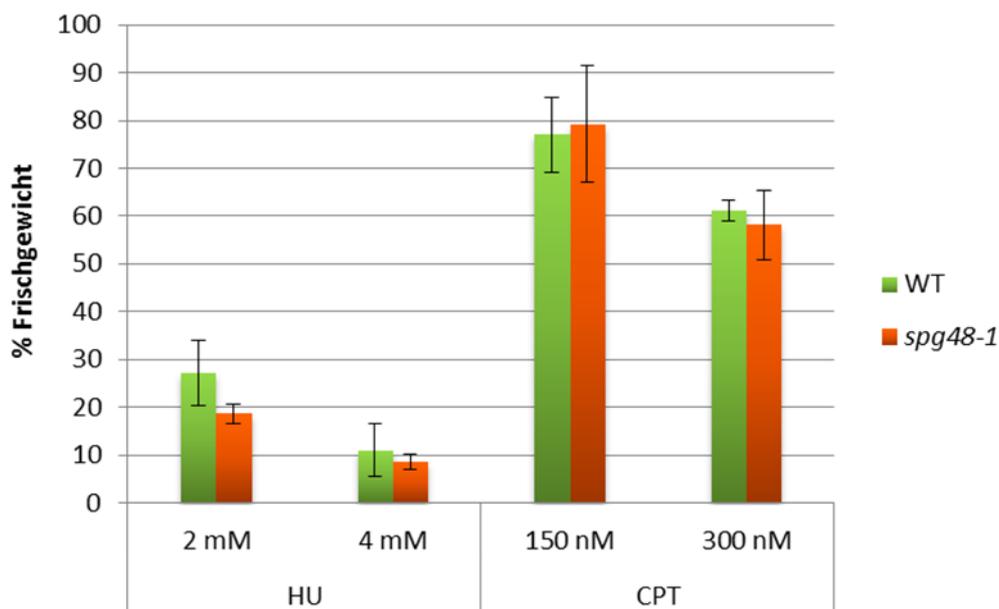


Abbildung 34: Untersuchung von *spg48-1* auf Hypersensitivität gegenüber HU und CPT. Die Mutante zeigt keine vom Wildtyp abweichende Sensitivität gegenüber den getesteten Genotoxinen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten mit Standardabweichungen (WT = Wildtyp; HU = Hydroxyurea; CPT = Camptothecin).

Tabelle 11: Interhomologe Rekombination in *spg48-1*. Aufgeführt sind die Ergebnisse der einzelnen Assays mit und ohne Induktion durch Bleomycin jeweils in Bezug auf die Anzahl der blauen Sektoren des Wildtyps, sowie der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (StabW). Außerdem ist das Signifikanzniveau eines zweiseitigen Student-t-Tests (p-Wert) zur Bestimmung einer signifikanten Differenz der prozentualen Anzahl blauer Sektoren zwischen dem Wildtyp und *spg48-1* dargestellt.

Linie	Bleomycin	relative Anzahl blauer Sektoren in %			MW	StabW	p-Wert
<i>spg48-1</i>	0 µg/ml	93,30	73,34	23,65	63,43	35,86	0,22
	5 µg/ml	80,59	71,80	60,25	70,88	10,20	0,04

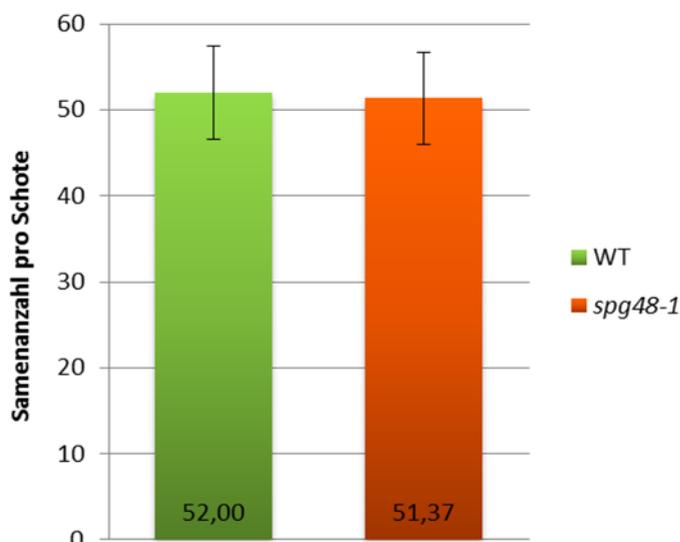


Abbildung 35: Fertilitätsanalyse von *spg48-1*. Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Samenanzahl pro Schote von *spg48-1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Beide Zahlenwerte sind an der Basis der Balken angegeben. Die Standardabweichung betrug in beiden Fällen jeweils ca. 5,4. Es ist keine Reduktion der Samenanzahl für *spg48-1* zu erkennen (WT = Wildtyp).

ANTIKÖRPERGEWINNUNG

Tabelle 12: PCR zur Gewinnung des Klonierungsfragments RTEL1-C. Die Tabelle zeigt den zu amplifizierenden Bereich aus AtRTEL1, die Zahlenangaben beziehen sich auf die Basenpaare im Gen. Außerdem sind die verwendete Primerkombination, die ungefähre Produktgröße und die Annealingtemperatur ($T_{\text{Annealing}}$) dargestellt.

Bereich	Primerkombination	ungefähre Produktgröße	$T_{\text{Annealing}}$
RTEL1 1922-3123	RTEL1-1922fw / RTEL1-Stopp-RV	1200 bp	56 °C

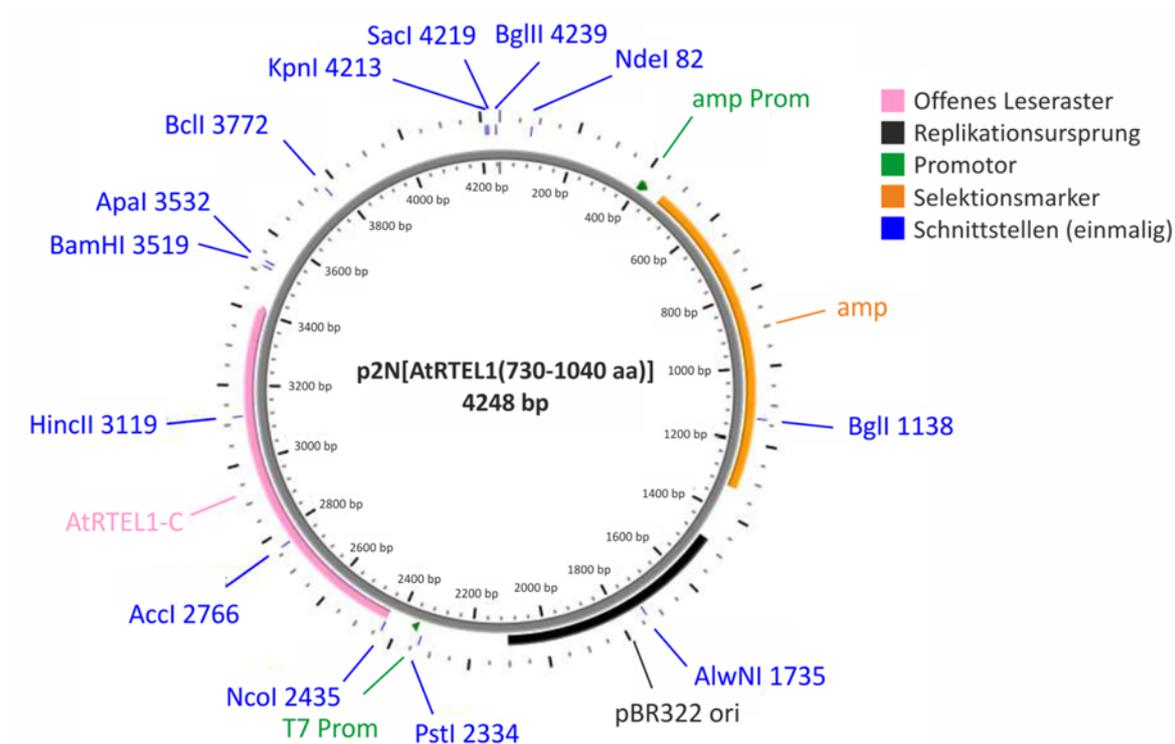


Abbildung 36: Expressionsvektor für RTEL1-C. Dargestellt ist der von Metabion/Primm klonierte Vektor zur Expression des Fragments RTEL1-C zur Gewinnung von Antigen zur Immunisierung. Es sind alle Schnittstellen eingezeichnet, die nur einmal vorkommen, sowie das Gen des Selektionsmarker Ampicillin (amp), außerdem die Lage des offenen Leserasters des Fragments RTEL1-C. Die Nummerierung entspricht der Lage im Vektor (bp = Basenpaare; Prom = Promotor; ori = Replikationsursprung; Abbildung verändert nach dem Vektordatenblatt, Metabion).

Publikationen

Teile der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse gingen in nachfolgende Publikationen ein:

Seeliger, K., Dukowic-Schulze, S., Wurz-Wildersinn, R., Pacher, M. and Puchta, H. (2011). "BRCA2 is a mediator of RAD51- and DMC1-facilitated homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*." New Phytol **accepted for publication**.

Trapp, O., Seeliger, K. and Puchta, H. (2011). "Homologs of breast cancer genes in plants." Front. Plant Sci. **2**(19): doi: 10.3389/fpls.2011.00019

Weitere Publikation:

Kobbe, D., Blanck, S., Demand, K., Focke, M. and Puchta, H. (2008). "AtRECQ2, a RecQ helicase homologue from *Arabidopsis thaliana*, is able to disrupt various recombinogenic DNA structures *in vitro*." Plant J **55**(3): 397-405.

(Geburtsname: Katharina Demand)

Erklärung

Die Experimente, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, wurden im Zeitraum vom Juni 2007 bis Oktober 2011 am Botanischen Institut, Lehrstuhl II – Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen des Karlsruher Instituts für Technologie (ehemals Universität Karlsruhe (TH)) durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe alle Stellen, die dem Wort oder Inhalt nach aus anderen Werken stammen, durch die Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Des Weiteren habe ich die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der gültigen Fassung vom 09. Juli 2010 bzw. die der Universität Karlsruhe (TH) vom 15. Januar 2002 beachtet.

Ort, Datum

Katharina Seeliger

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geboren am 31.05.1983

In Schwäbisch Hall

Verheiratet mit Florian Seeliger, Dipl.-Ing. Mess- und Regelungstechnik

BERUFLICHE PRAXIS

06/2007 – 12/2011 Tätigkeit als Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), ehemals Universität Karlsruhe (TH), Botanisches Institut, Lehrstuhl II – Molekularbiologie und Biologie der Pflanzen im Rahmen der Promotion

STUDIUM

06/2007 – 12/2011 Promotionsstudium am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), ehemals Universität Karlsruhe (TH), Botanisches Institut, Lehrstuhl II – Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen

10/2002 – 05/2007 Studium an der Universität Karlsruhe (TH); jetzt Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Lehramt im Hauptfach Biologie und im Hauptfach Chemie

Schulpraxissemester am Walahfrid Strabo Gymnasium in Rheinstetten

Abschluss: Wissenschaftliche Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien

SCHULISCHE AUSBILDUNG

09/1993 – 07/2002 Schenk von Limpurg Gymnasium Gaildorf

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1989 – 07/1993 Grundschule Gaildorf