

**Funktionelle Analyse des Strukturproteins *AtRMI1*  
in der somatischen und meiotischen Rekombination  
in *Arabidopsis thaliana***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte  
DISSERTATION

von  
Diplom-Biologin Simone Bonnet

aus Bretten

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Holger Puchta

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2013

## ***Danksagung***

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Holger Puchta am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen am Karlsruher Institut für Technologie durchgeführt. Besonderer Dank gilt daher an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Holger Puchta für die Möglichkeit meine Dissertation an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen. Ich bedanke mich für den Freiraum der mir zur Bearbeitung meines Promotionsthemas gewährt wurde und natürlich auch für die Mittel die mir zur Verfügung gestellt wurden. Das Interesse an meinen Projekten und zahlreiche Diskussionen über neuste Ergebnisse und Erkenntnisse haben mich stets in meiner Arbeit bestärkt und mir über kleinere Durststrecken hinweg geholfen.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Für die stete Unterstützung in allen Belangen gebührt Herrn Dr. Alexander Knoll besonderer Dank. Die kritischen und konstruktiven Diskussionen waren mir während der letzten Jahren immer sehr willkommen und extrem hilfreich. Auf seine Unterstützung in theoretischen und methodischen Fragen konnte ich mich immer verlassen.

Dies gilt ebenso für das kritische Auge von Herrn Dr. Manfred Focke, die konstruktiven Ratschläge in Bezug auf meine praktischen Arbeiten und auch die schriftliche Arbeit waren mir sehr willkommen!

Ein großes Dankeschön geht auch an Priv. Doz. Dr. Frank Hartung der hier in Karlsruhe und auch noch in Quedlinburg stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen ehemaligen Bürokolleginnen Frau Dr. Susan Schröpfer, Frau Dr. Jacqueline Klimesch und meiner aktuellen Büro- und Labornachbarin Frau Dipl.-Biol. Julia Recker: Im wissenschaftlichen Bereich aber auch im Privaten konnte ich immer auf euch zählen. Ich danke euch für fachliche Diskussionen, für Verständnis und Aufmunterungen wenn es mal wieder nicht vorwärts ging und vor allem für eure Freundschaft!

Ein herzliches Dankeschön geht an Jana Bender, durch ihr unendliches Engagement, ihre schnelle Auffassungsgabe und die sorgfältige und selbstständige Arbeitsweise im Labor war

sie für mich innerhalb kürzester Zeit unentbehrlich. Ihre Motivation und gute Laune sind ansteckend und kennen anscheinend auch nach unzähligen Shortys keine Grenzen.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei Mandy Meier und Sabrina Wagner für die wertvolle Unterstützung in Zeiten mit „etwas“ mehr Arbeit. Ohne Euch wäre so manches Ergebnis nicht möglich gewesen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen nicht namentlich erwähnten Kollegen. Meine Arbeit war nicht der einzige Grund warum ich auch mal länger bei der Arbeit war.

Für die Anzucht und Pflege meiner vielen Arabidopsispflanzen im Gewächshaus bedanke ich mich herzlichst beim Gartenpersonal. Insbesondere danke ich Frau Traudel Wehrle, da sie meine Pflanzen stets im Blick hatte und bei jeder weiteren sterilen Pflanze mit mir litt und verzweifelte.

Ganz besonderer Dank gebührt ebenfalls meiner Familie und meinen Freunden, die es stets verstanden haben, wenn auch am Wochenende das Labor mal wieder wichtiger war.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung in wirklich jeder Lebenslage, so manches wäre ohne sie nur schwer zu erreichen gewesen.

Meinem Freund, Jan Klotz danke ich neben fachlichen Diskussionen vor allem dafür, dass es ihn gibt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>

## 1 Einleitung

1.1 Die Entstehung von DNA-Schäden und deren Reparatur .....	1
1.1.1 Direkte DNA-Reparatur .....	2
1.1.2 Photoreaktivierung .....	3
1.1.3 Nukleotidexzisionsreparatur .....	3
1.1.4 Basenexzisionsreparatur .....	4
1.1.5 <i>Mismatch</i> -Reparatur .....	4
1.1.6 Reparatur replikationsassoziierter DNA-Schäden .....	5
1.2 Doppelstrangbruchreparatur .....	6
1.2.1 <i>Non-homologous end joining</i> .....	6
1.2.2 <i>Single-strand-annealing</i> .....	8
1.2.3 Somatische homologe Rekombination .....	9
1.2.3.1 Initiation der homologen Rekombination .....	9
1.2.3.2 <i>Synthesis-dependent strand-annealing</i> .....	10
1.2.3.3 <i>Double strand break repair</i> .....	12
Der Endonukleasekomplex RuvABC und die Resolvase RuvA .....	12
Der Endonukleasekomplex SLX1/SLX4 .....	13
Der Endonukleasekomplex MUS81/EME1 .....	14
Die Resolvase GEN1 .....	16
1.2.3.5 <i>Dissolution</i> .....	17
1.2.4 Rekombination in der Meiose .....	17
1.2.5 Proteine der meiotischen Rekombination in <i>A. thaliana</i> .....	18
1.3 Der RTR-Komplex .....	22
1.3.1 Topoisomerase und Helikase des RTR-Komplexes .....	24
1.3.2 RMI1 des RTR-Komplexes .....	24
1.3.3 RMI2 des RTR-Komplexes .....	25
1.4 Ziele dieser Arbeit .....	26



## 2 Material und Methoden

2.1	Geräte .....	28
2.1.1	Binokulare und Mikroskope .....	28
2.1.2	Elektroporation .....	28
2.1.3	Heizblöcke, Schüttler, Inkubatoren .....	28
2.1.4	Sicherheitswerkbänke und Reinraumbänke .....	28
2.1.5	Thermocycler und Zubehör für PCR .....	29
2.1.6	Zentrifugen .....	29
2.1.7	Sonstiges .....	29
2.2	Chemikalien .....	30
2.3	Medien, Puffer und Lösungen .....	30
2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	30
2.3.2	Einfache DNA-Isolierungen .....	31
2.3.3	Histochemische Färbung .....	31
2.3.4	Medien zur Anzucht für Pflanzen und Bakterien .....	31
2.3.5	Meiocytenpräparation .....	32
2.3.6	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
2.4	Medienzusätze und Genotoxine .....	33
2.4.1	Medienzusätze .....	33
2.4.2	Genotoxinlösungen .....	33
2.5	Enzyme .....	34
2.5.1	Polymerasen .....	34
2.5.2	Restriktionsendonukleasen .....	34
2.5.3	Weitere Enzyme .....	34
2.6	Plasmide .....	35
2.7	Oligonukleotide .....	36
2.8	Kits .....	36
2.9	Organismen und transgene Linien .....	37
2.9.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> - GV3101::pMP90 .....	37
2.9.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> – AH109 .....	37
2.9.3	<i>Escherichia coli</i> – NEB 5-alpha .....	37
2.9.4	<i>Escherichia coli</i> – JM110 .....	37
2.9.5	<i>A. thaliana</i> – T-DNA-Insertionsmutanten bzw. Deletionsmutanten .....	37
2.9.6	<i>A. thaliana</i> – Transformationslinien .....	38
2.10	Software und Datenbanken .....	40
2.11	Isolierung von Nukleinsäuren .....	40
2.11.1	Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial .....	40
2.11.2	Isolation von RNA aus <i>A. thaliana</i> .....	41
2.11.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	41

2.12	<i>In vitro</i> Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	41
2.12.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.12.2	Polymerase Kettenreaktion .....	42
2.12.3	PCR-basierte Verlängerung von DNA-Fragmenten .....	42
2.12.4	Overlap-Extension PCR .....	43
2.12.5	Colony-PCR .....	43
2.12.6	PCR-basierte Genotypisierung von T-DNA Insertionslinien bzw. Deletionsmutanten .....	43
2.12.7	cDNA-Synthese .....	45
2.12.8	Quantitative Real-Time PCR .....	45
2.12.9	Restriktionsverdau .....	46
2.12.10	Dephosphorylierung .....	46
2.12.11	Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	46
2.12.12	Aufreinigung von Nukleinsäuren vom Agarosegel .....	46
2.12.13	Ligation von DNA-Fragmenten .....	47
2.12.14	Homologie-basierte Klonierung .....	47
2.12.15	Sequenzierung .....	47
2.13	Transformation von DNA in Organismen .....	48
2.13.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	48
2.13.2	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> .....	48
2.13.3	Transformation von <i>A. thaliana</i> .....	49
2.14	Pflanzenspezifische Methoden .....	49
2.14.1	Lagerung von Saatgut .....	49
2.14.2	Pflanzenanzucht im Gewächshaus .....	49
2.14.3	Oberflächensterilisation von <i>A. thaliana</i> Saatgut - sterile Pflanzenanzucht .....	49
2.14.4	Kreuzungen von <i>A. thaliana</i> .....	50
2.14.5	Linienetablierung nach der Transformation von <i>A. thaliana</i> .....	50
2.14.6	Sensitivitätstests .....	51
2.14.7	Bestimmung der Rekombinationsrate .....	52
2.14.8	Präparation männlicher Meiozyten .....	53

### 3 Ergebnisse

3.1	Funktionelle Untersuchungen zu <i>AtRMI1 in planta</i> .....	54
3.1.1	Experimenteller Aufbau des Komplementationsversuchs .....	54
3.1.2	Expression der RMI1-Komplementationskonstrukte im Wildtyp .....	59
3.1.3	Komplementation der somatischen Phänotypen von <i>Atrmi1-2</i> mit dem Konstrukt <i>RMI1</i> .....	61
3.1.4	Funktion der DUF1767 Domäne im N-Terminus .....	63
3.1.5	Funktion der OB-fold Domäne 1 im N-Terminus .....	65

3.1.6	Funktion der OB-fold Domäne 2 im C-Terminus .....	67
3.1.7	Funktion des N-Terminus (DUF1767 und OB-fold Domäne 1) .....	69
3.1.8	Komplementation des meiotischen Phänotyps von <i>Atrmi1-1</i> .....	71
3.2	Untersuchungen zur HJ-Resolution durch verschiedene Resolvasen .....	75
3.2.1	Experimenteller Ansatz zur Expression verschiedener Resolvasen in <i>Atrmi1</i> .....	76
3.2.1.1	Expressionskonstrukte <i>AtGEN1</i> .....	78
3.2.1.2	Expressionskonstrukte des Endonukleasekomplexes <i>AtMUS81/AtEME1A</i> .....	78
3.2.1.3	Expressionskonstrukte des Endonukleasekomplexes ScSlx1/ScSlx4 .....	79
3.2.1.4	Expressionskonstrukte <i>EcRusA</i> .....	80
3.2.1.4	Expressionskonstrukte des bakteriellen Resolvasekomplexes <i>EcRuvABC</i> .....	80
3.2.2	Auswirkungen der Resolvase-Konstrukte auf die <i>Atrmi1-1</i> Mutanten .....	81
3.3	Generierung von Doppelmutanten mit <i>Atrmi1</i> .....	82
3.3.1	Die Doppelmutante <i>Atrmi1-2 mus81-1</i> IC9C .....	83

## 4 Diskussion

4.1	Funktionelle Domänenanalyse zu <i>AtRMI1 in planta</i> .....	86
4.1.1	Expression der <i>RMI1</i> -Varianten im Wildtyp (IC9C) .....	87
4.1.2	Komplementierung der <i>Atrmi1</i> Mutanten .....	88
4.1.3	Funktion des N-Terminus (DUF1767 Domäne und OB-fold Domäne 1) .....	90
4.1.4	Funktion des C-Terminus (OB-fold Domäne 2) .....	92
4.2	Expression verschiedener Resolvasen in <i>Atrmi1-1</i> .....	93
4.3	Genetische Interaktion zwischen <i>AtRMI1</i> und <i>AtMUS81</i> .....	94
4.4	Zusammenfassung .....	98
4.5	Summary .....	99

## 5 Literaturverzeichnis

## 6 Anhang

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Mechanismus der nicht-homologen Endverknüpfung und der Mikrohomologie abhängigen Endverknüpfung. ....	7
1.2	Mechanismus des <i>single-strand annealing</i> (SSA). ....	8
1.3	Intrachromosomale, allelische und ektopische Rekombination. ....	9
1.4	Mechanismen der Reparatur von DSBs durch homologen Rekombination. ....	11
1.5	Schematische Darstellung der zellbiologisch aufeinanderfolgenden Stadien der meiotischen Prophase I und der parallel verlaufenden molekularen Prozesse der homologen Rekombination. ....	19
2.1	Schematische Darstellung der Mutanten <i>Atrmi1-1</i> und <i>Atrmi1-2</i> anhand der Intron-Exon-Struktur von <i>AtRMI1</i> . ....	38
2.2	Prinzip der Genotypisierung für T-DNA-Insertionslinien. ....	44
2.3	Prinzip der Genotypisierung der <i>Atrmi1-1</i> Deletionsmutante. ....	44
3.1	Alignment der RMI1-Homologe aus <i>A. thaliana</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>M. musculus</i> und <i>O. sativa</i> . ....	55
3.2	Übersicht der T-DNA-Bereiche der verschiedenen RMI1-Komplementationsvektoren. ....	56
3.3	Klonierungsschema zum Plasmid pRMI1. ....	57
3.4	Relative normalisierte Expression der verschiedenen RMI1-Konstrukte im Wildtyp (IC9C). ....	60
3.5	Auswirkungen der RMI1-Komplementationskonstrukte auf den Wildtyp (IC9C). ....	61
3.6	Relative normalisierte Expression von <i>RMI1</i> des WT-Konstruktes <i>RMI1</i> in <i>Atrmi1-2</i> . ....	62
3.7	Komplementation der <i>Atrmi1-2</i> Mutante mit dem Konstrukt <i>RMI1</i> . ....	63
3.8	Relative normalisierte Expression von <i>RMI1ΔDUF</i> des Deletionskonstruktes in <i>Atrmi1-2</i> . ....	64
3.9	Komplementation der <i>Atrmi1-2</i> Mutante mit dem Deletionskonstrukt <i>RMI1ΔDUF</i> . ....	65
3.10	Relative normalisierte Expression des Deletionskonstruktes <i>RMI1ΔOB1</i> in <i>Atrmi1-2</i> . ....	66
3.11	Komplementation der <i>Atrmi1-2</i> Mutante mit <i>RMI1ΔOB1</i> . ....	67

3.12	Relative normalisierte Expression von <i>RMI1</i> des Deletionskonstruktes <i>RMI1ΔOB2</i> in <i>Atrmi1-2</i> . .....	68
3.13	Komplementation der <i>Atrmi1-2</i> Mutante mit <i>RMI1ΔOB2</i> . .....	69
3.14	Relative normalisierte Expression des Deletionskonstruktes <i>RMI1ΔDUFΔOB1</i> in <i>Atrmi1-2</i> . .....	70
3.15	Komplementation der <i>Atrmi1-2</i> Mutante mit dem Deletionskonstrukt <i>RMI1 DUF OB1</i> . .....	70
3.16	Auswirkung der fünf <i>RMI1</i> -Konstrukte auf die Fertilität des Wildtyps und der <i>rmi1-1</i> Mutante. ....	73
3.17	Schoten einer Wildtyppflanze (A), der sterilen Linie <i>rmi1-1::RMI1ΔOB1</i> (B) und der sterilen <i>Atrmi1-1</i> Mutante (C). ....	73
3.18	Meiosestadien des Wildtyp (IC9C) und der <i>Atrmi1-1</i> Mutante. ....	74
3.19	Ausgewählte Meiosestadien aus der cytologischen Untersuchung der <i>Atrmi1-1</i> -Komplementationslinien. ....	75
3.20	<i>Multiple cloning site</i> (MCS) des Vektors pSBO-2. ....	77
3.21	T-DNA-Bereich der Grundvektoren zur Klonierung der Resolvasen-Konstrukte. ....	78
3.22	Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-GEN1 und p(RMI2-P)-GEN1. ....	78
3.23	Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-MUS81/EME1A und p(RMI2-P)-MUS81/EME1A. ....	79
3.24	Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-ScSLX1/ScSLX4 und p(RMI2-P)-ScSLX1/ScSLX4. ....	79
3.25	Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-EcRusA und p(RMI2-P)-EcRusA. ....	80
3.26	Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-EcRuvABC und p(RMI2-P)-EcRuvABC. ....	81

## Tabellenverzeichnis

2.1	Medienzusätze. ....	33
2.2	Genotoxine. ....	34
2.3	Plasmide. ....	35
2.4	Verwendete T-DNA-Insertionsmutanten und Deletionsmutanten. ....	38
2.5	Etablierte und verwendete Transformationslinien. ....	39
2.6	Verwendete Genotoxinkonzentrationen für Sensitivitätstests. ....	52
3.1	Komplementation des sterilen Phänotyps der <i>Atrmi1-1</i> Mutante. ....	72
3.2	Übersicht der genotypisierten <i>Atrmi1-1</i> -Expressionslinien. ....	82

## Abkürzungsverzeichnis

AP-Stelle	apurinische/apyrimidinische Stelle
AS	Aminosäure(n)
At, <i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	<i>complementary</i> DNA
Cisplatin	cis-Diamin-dichloro-platin (II)
CO	Crossover
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
C-terminal	Carboxyterminal
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA damage response
D-Loop	<i>displacement loop</i>
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur, <i>double strand break repair</i>
dsDNA	<i>double stranded</i> DNA
Ec, <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
F	Filialgeneration
gDNA	genomische DNA
GM	germination Medium
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
HJ, dHJ	Holliday Junction, doppelte Holliday Junction
HR	homologe Rekombination
IDL	<i>insertion-deletion-loop</i>
kb	Kilobasenpaare

---

LB	(1) left border; (2) lysogeny broth Medium
MMEJ	microhomology-mediated end-joining
MMR	Mismatch-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
NCO	Nicht-Crossover, non crossover
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung, <i>non-homologous end-joining</i>
N-terminal	Aminoterminal
NTP	Nukleotidtriphosphat
ORF	open reading frame
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
PRR	Postreplikative Reparatur
ppm	parts per million
PPT	Phosphinothricin
RB	right border
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
Sc, <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC	Synaptonemaler Komplex, <i>synaptonemal complex</i> ,
SCE	Schwesterchromatidaustausch, <i>sister chromatid exchange</i>
SDSA	<i>synthesis-dependent strand-annealing</i>
SSA	<i>single-strand annealing</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
T	Transformationsgeneration
TAIR T	The Arabidopsis Information Resource
T-DNA	Transfer-DNA
Ti	Tumor-induzierend
TLS	Translasionssynthese
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
U	Unit
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
X-GlcA	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl- <i>b</i> -D-glucuronid)cyclohexyl-Ammoniumsalz



# 1 Einleitung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Träger der Erbinformation und somit Grundlage des Lebens. Sie speichert Informationen für die Grundlagen einer Zelle und macht es möglich, diese an Folgegenerationen weiterzugeben. Jedoch setzt die Funktionalität eines Organismus und die Weitergabe der genetischen Information an seine Nachkommen die Integrität und Stabilität des Genoms voraus. Diverse DNA-schädigende Einflüsse, endogener oder exogener Natur, können zu Mutationen und Brüchen in der DNA führen und somit die Genomstabilität gefährden. Um diese zu gewährleisten, existieren verschiedenste, konservierte DNA-Reparaturwege. Der Mechanismus der homologe Rekombination (HR) spielt hierbei eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüche und replikationsassoziierten Schäden. Eine weitere wichtige Funktion der HR bezieht sich auf die Reparatur meiotisch auftretender DSBs. Im Gegensatz zu somatischen Zellen werden in meiotischen Zellen DSBs kontrolliert induziert. Diese werden ausschließlich mittels HR repariert, um die korrekte Segregation der homologen Chromosomen und die Neukombination genetischer Informationen zu ermöglichen (Keeney, 2001; Puchta 2005). Die Mechanismen der HR beruhen auf der Verwendung homologer Sequenzen im Genom, die als Matrize zur Reparatur beschädigter DNA dienen. In somatischen Zellen dient die DNA-Rekombination der Reparatur von beschädigtem Erbmaterial. Die genomische Stabilität wird durch das Beseitigen von DSBs mittels Rekombinationsreparatur in somatischen Zellen erhalten. Während der Reparatur von DSBs über HR entstehen verschiedene Rekombinationsintermediate, wie zum Beispiel die doppelte Holliday Junction (dHJ), die ein zentrales Element der HR darstellt. Um die Segregation der homologen Chromosomen zu ermöglichen, müssen die Verknüpfungen wieder gelöst werden, bevor die homologen Chromosomen während der Anaphase I zu den Zellpolen gezogen werden.

## 1.1 Die Entstehung von DNA-Schäden und deren Reparatur

Unabhängig von der Lebensweise ist das Genom eines jeden Organismus kontinuierlich exogenen und endogenen DNA-schädigenden Einflüssen ausgesetzt, wodurch die Zelle genotoxisch beeinträchtigt werden kann. Pflanzen sind aufgrund ihrer sessilen Lebensweise besonders betroffen, da sie dem durch exogene Faktoren verursachten Stress nicht ausweichen können. Des Weiteren besitzen Pflanzen im Gegensatz zu Säugetieren keine

prädeterminierte Keimbahn. So entwickeln sich aus vegetativen Geweben, die bereits mehrere Proliferationsschritte durchlaufen haben, generative Zellen. Daher können somatische Veränderungen des genetischen Materials auf diesem Weg auch in die Keimbahn gelangen und an die nächste Generation weitergegeben werden (Walbot, 1985; Ries *et al.*, 2000).

Um die Integrität und die Stabilität des Genoms einer jeden Zelle zu gewährleisten, ist es daher wichtig, die unterschiedlichen DNA-Schäden möglichst fehlerfrei zu reparieren. Hierfür entwickelten sich im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Reparaturmechanismen, um diverse DNA-Läsionen zu beheben (de Laat *et al.*, 1999).

Die Schädigung des Genoms kann durch biotische und abiotische exogene Faktoren erfolgen, dazu werden beispielsweise UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, aromatische Verbindungen oder Schwermetalle gezählt (Tuteja *et al.*, 2009; Lieberman-Lazarovich und Levy, 2011). Ebenso gehören Genotoxine, die von Pilzen oder Bakterien zur Abwehr produziert werden, zu den biotischen Umwelteinflüssen (Friedberg *et al.*, 2005). Endogene genotoxische Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies (*reactiv oxygen species*, ROS,) entstehen im Laufe metabolischer Prozesse jeder aeroben Zelle. Die oxidative Schädigung der Zelle durch ROS bezieht sich auch Lipide, Proteine und die DNA. Zu den möglichen DNA-Schäden gehören unter anderem Modifikationen von DNA-Basen, Einzel- und Doppelstrangbrüche, der Verlust von Purinbasen oder Schädigungen der Desoxyribose des DNA-Rückgrats.

Ebenso beeinflussen auch Fehler während der Replikation den Erhalt der Genomintegrität. Diese werden zwar durch die Korrekturlesefunktion und 3'-5'-Exonukleaseaktivität replikativer Polymerasen gering gehalten, trotzdem kommt es während der S-Phase zum Einbau nicht komplementärer Basen (Kunkel und Bebenek, 2000; Khare und Eckert, 2002).

### 1.1.1 Direkte DNA-Reparatur

Die direkte DNA-Reparatur oder Schadensreversion (direct reversal, DR) und auch die Photoreaktivierung sind einfache Mechanismen zur Beseitigung bestimmter chemischer Basenmodifikationen und DNA-Läsionen, die jeweils durch ein einzelnes Enzym ausgeführt werden.

Alkyltransferasen gehören beispielsweise zu den Enzymen der DR. In einer Licht-unabhängigen Reaktion kann die Alkylgruppe einer alkylierten Base auf einen Cystein-Rest des Enzyms selbst übertragen werden. Methyliertes Guanin kann in geringem Maße durch reaktive Metabolite entstehen. Aufgrund der veränderten Basenpaarungseigenschaften des O<sup>6</sup>-Methylguanin entstehen während der Replikation Punktmutation, die im Anschluss über Mismatch-Reparatur behoben werden könnten (Ellison *et al.*, 1989). Ein schneller und fehlerfreier Mechanismus in Bakterien, Hefen und Säugern, ist dagegen die Übertragung der Methylgruppe von der O<sup>6</sup>-Position des methylierten Guanin auf ein internes Cystein der Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) (Britt, 1996; Lindahl und Wood, 1999; Tuteja *et al.*, 2009).

### 1.1.2 Photoreaktivierung

Neben der Alkylierung von Basen durch reaktive Metabolite sind Pflanzen ebenfalls der oxidativen Schädigung durch die UV Strahlung des Sonnenlichts ausgesetzt. UV Strahlung kann zur Bildung von freien Radikalen führen, welche die Entstehung oxidativer DNA-Basenmodifikationen fördern (Kielbassa *et al.*, 1997). Ebenso ist es möglich die DNA durch direkte Anregung mit UV-B oder UV-C Strahlung zu schädigen (Jansen *et al.*, 1998). Die häufigsten kovalenten Verknüpfungen der DNA, die durch UV Strahlung verursacht werden, sind Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und (6-4)-Photoprodukte ((6-4)-PP) (Lippke *et al.*, 1981; Sancar und Rupp, 1983; Mitchell *et al.*, 1991). Die dadurch entstehende Verzerrung der DNA-Doppelhelix verhindert unter anderem die Prozessierung der DNA durch DNA- oder RNA-Polymerasen. Durch den Mechanismus der lichtabhängigen Photoreaktivierung mit Hilfe von substratspezifischen Photolyasen (CPD-Photolyasen, (6-4)-Photolyasen), können diese DNA-Schäden revertiert werden. Die benötigte Energie (300 nm bis 600 nm) für diesen Vorgang wird durch Chromophoren (5,10-Methylentetrahydrofolat oder 8-Hydroxy-5-Desazariboflavin) absorbiert und die Anregungsenergie auf den reduziert vorliegenden Redox-Kofaktor FADH<sup>•</sup> transferiert. Durch die Übertragung eines Elektrons wird die kovalente Verbindung zwischen den Basendimeren durch Umordnung der Elektronen aufgelöst. Aus FADH<sup>•</sup> wird anschließend durch die Rückübertragung eines Elektrons die aktive Form des Flavins FADH<sup>•</sup> regeneriert (Thompson und Sancar, 2002; Waterworth *et al.*, 2002; Sancar 2003; Essen und Klar 2006; Tuteja *et al.*, 2009; Brettel und Byrdin 2010).

### 1.1.3 Nukleotidexzisionsreparatur

Die Photoreaktivierung ist zwar der bevorzugter Mechanismus zur Reparatur UV-induzierter Schäden, aber in Abwesenheit von Licht oder in Organismen ohne entsprechende Photolyase nicht möglich. Durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) können DNA-Schäden, die eine Verzerrung der DNA-Doppelhelix verursachen, ebenfalls eliminiert werden (Sancar und Reardon, 2004; Reardon und Sancar 2005). Hierzu zählen chemisch und strukturell verschiedene DNA-Schäden wie Pyrimidindimere, aber auch größere Addukte an den Basen der DNA, welche die Replikation und Transkription behindern. Die Schäden, die mit Hilfe der NER prozessiert werden, sind jeweils auf einen DNA-Strang begrenzt (Britt 2002; Gillet und Schärer, 2006).

Die Gliederung der NER in zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgt nach der Erkennung des Schadens. DNA-Läsionen, die zur Blockade der Transkription führen, werden durch die *transcription-coupled* NER (TC-NER) behoben. Schäden, die in allen anderen Bereichen, einschließlich der transkriptionell inaktiven Bereiche des Genoms liegen, werden durch die *global genome* NER (GG-NER) repariert (Mu und Sancar, 1997; Friedberg *et al.*, 2006; Novarina *et al.*, 2011; Lagerwerf *et al.*, 2011). Die Prozessierung der DNA-Läsion verläuft in beiden Mechanismen gleich: Im Anschluss an die Assemblierung des *Pre-Incision*-Komplex

wird die DNA um die Schadenstelle durch eine Helikase entwunden. Der nicht geschädigte DNA-Einzelstrang wird durch RPA ummantelt, um zu verhindern, dass auch dieser geschnitten wird. Eine Endonuklease schneidet den beschädigten Strang beidseits der Schadenstelle und löst ein 24 nt bis 32 nt langes Oligonukleotid heraus. Die entstandene Lücke wird durch DNA-Polymerasen und Ligasen des *Post-Inicison*-Komplex wieder aufgefüllt und geschlossen (Tuteja *et al.*, 2009; Staresincic *et al.*, 2009; Giannattasio *et al.*, 2010; Novarina *et al.*, 2011).

#### 1.1.4 Basenexzisionsreparatur

Im Gegensatz zur NER werden bei der Basenexzisionsreparatur (BER) DNA-Schäden beseitigt, die auf chemische Modifikationen an Basen wie beispielsweise Alkylierung, Desaminierung oder Hydrolyse zurückzuführen sind. Durch spezifische DNA-Glykosylasen wird die veränderte Base erkannt und aus dem Nukleotid entfernt (Fromme *et al.*, 2004). An der entstandenen apurinen beziehungsweise apyrimidinen Stelle (AP-Stelle) wird durch eine AP-Endonuklease ein Einzelstrangbruch im Phosphodiester-Rückgrat im 5'-Bereich der AP-Stelle erzeugt (Liu *et al.*, 2007). Abhängig von der Anzahl der entfernten Nukleotide wird in *short-patch* BER und *long-patch* BER unterschieden, wobei zwischen 1 nt und 13 nt entfernt werden können (Baute und Depicker, 2008). Während der *short-patch* BER wird der entstandene Bruch mit einem unbeschädigten Nukleotid aufgefüllt. In der *long-patch* BER dagegen wird die entstandene Lücke über Reparaturpolymerasen (Pol I in Prokaryoten, Pol  $\beta$  in Eukaryoten) aufgefüllt und der beschädigte Einzelstrang durch die Reparatursynthese verdrängt (Lu *et al.*, 2001; Beard und Wilson, 2006). Der überstehende Einzelstrangbereich wird durch eine Flap-Endonuklease entfernt und das DNA Rückgrat durch eine DNA-Ligase geschlossen (Friedberg 2006; Tomkinson *et al.*, 2006; Fortini und Dogliotti, 2007).

#### 1.1.5 Mismatch-Reparatur

Die Mismatch-Reparatur (MMR) ist postreplikativ aktiv und erkennt Fehlpaarungen von Basen und Insertions- beziehungsweise Deletions-Loops (*insertion-deletion-loop*, IDL) in der DNA. Diese können während der Replikation, vor allem in Bereichen repetitiver Sequenzen, aber auch durch Homologe Rekombination entstehen (Modrich und Lahue, 1996; Kunkel und Erie, 2005; Kunkel, 2004; Iyer *et al.*, 2006; Friedberg *et al.*, 2006; Fukui, 2010). Die Komponenten des MMR-System sind in allen Organismen hochkonserviert. Homologe zu den initialen MMR-Faktoren MutS und MutL aus *E. coli* konnten ebenso in Hefe, in Säugern und in Pflanzen identifiziert werden (Harfe und Jinks-Robertson, 2000a, 2000b). Die Erkennung der Fehlpaarung verläuft über die MutS-Homologe, woraufhin die MutL-Homologe an den *Mismatch* binden. Die Aktivierung der Endonuklease MutH erfolgt anschließend durch MutL. Durch die Endonuklease wird 3' oder 5' der Schadensstelle ein Einzelstrangbruch eingefügt. Die Prozessierung des fehlerhaften Einzelstrangs erfolgt mit Hilfe einer Exonuklease. Die

entstandene Lücke wird über Reparatursynthese aufgefüllt und mittels Ligase geschlossen (Kunkel und Erie, 2005; Iyer *et al.*, 2006; Fukui, 2010).

### 1.1.6 Reparatur replikationsassoziierter DNA-Schäden

DNA-Läsionen in oder auf der DNA, wie modifizierte Basen und DNA-Addukte, die bis zum Eintritt in die S-Phase des Zellzykluses nicht repariert wurden, stellen eine Blockade für die Replikationsmaschinerie dar. Diese könnten letale Folgen für die Zelle haben, wenn dadurch die Ausführung der Replikation verhindert wird. Zwar wird die Anzahl an Schäden durch die zahlreichen Reparaturmechanismen der Zelle minimiert, es ist aber trotzdem nicht möglich, alle Läsionen zu beheben, bevor das Replisom darauf trifft (McGlynn und Lloyd, 2002). Da die replikativen DNA-Polymerasen nicht in der Lage sind, beschädigte DNA als Matrize zu nutzen, führt diese zum Arrest der Replikationsgabel. Wird die Replikation nicht fortgeführt, kann das chromosomale Veränderungen zur Folge haben, die wiederum zu Fehlfunktionen oder zur Apoptose führen können (Budzowska und Kanaar, 2008). Es gibt zwei Möglichkeiten die Replikation der DNA fortzuführen: Zum einen ein der HR-verwandter Reparaturmechanismus, der durch die direkte Reparatur des Schadens die weitere Ausführung der Replikation ermöglicht. Zum anderen ermöglicht es der Schadenstoleranzweg, die DNA-Läsion zu übergehen und die Replikation ohne Reparatur des DNA-Schadens fortzuführen.

Der Schadenstoleranzweg unterteilt sich in die Transläsionssynthese (TLS) und die Postreplikative Reparatur (PRR) (Andersen *et al.*, 2008; Unk *et al.*, 2010). Während der TLS wird die replikative Polymerase durch eine schadenspezifische TLS-Polymerase ausgetauscht (Lehmann, 2005; Andersen *et al.*, 2008; Hicks *et al.*, 2010; Ho und Schärer 2010). In Abhängigkeit von der prozessierenden TLS-Polymerase kann es sowohl zur fehlerfreien Behebung des Schadens kommen, als auch zum Einbau eines nicht-komplementären Nukleotids (Prakash *et al.*, 2005).

Die PRR ermöglicht die Toleranz des Schadens, indem die Sequenzinformation des unbeschädigten Elternstrangs für die Synthese genutzt wird. Dazu wird die Synthese am unbeschädigten parentalen Strang fortgeführt (*overshoot synthesis*), bevor es zur Arretierung der Replikation kommt. Durch die Regression der Replikationsgabel ist es möglich, dass der bereits synthetisierte Tochterstrang als Matrize für die Synthese des blockierten Tochterstrangs genutzt wird (*template-switching*) (Chen *et al.*, 2008; Mazloum und Holloman, 2009; Blastyak *et al.*, 2007; Blastyak *et al.*, 2010; Bugreev *et al.*, 2010). Es entsteht eine sogenannte „*Chicken Foot*“ Struktur, die topologisch einer HJ sehr ähnlich ist. Die Auflösung dieser Struktur kann über die erneute Umkehrung der Replikationsgabel erfolgen, so dass die Fortführung der Replikation möglich ist. Die *Chicken Foot* Struktur kann aber auch Ausgangspunkt für die Reparatur des Schadens über HR sein.

Die HR dient neben der TLS und der PRR als Möglichkeit zur Reparatur eines DSBs, wenn dieser während der Replikation durch exogene Faktoren entsteht oder ein Einzelstrangbruch

(ESB) durch den aktiven Replikationsprozess in einen replikationsassoziierten DSB umgewandelt wird (Khanna und Jackson, 2001; Doe *et al.*, 2002; Ciccia *et al.*, 2003).

## 1.2 Doppelstrangbruchreparatur

Doppelstrangbrüche in der DNA können durch verschiedene endogene und exogene Faktoren wie zum Beispiel ionisierende Strahlung, freie Radikale, während der Replikation oder durch mechanischen Stress entstehen und sind eine enorme Gefährdung für die Genomstabilität (Lieber, 2010). Im Gegensatz zum ESB ist beim DSB das Phosphatrückgrat zweier komplementärer DNA-Stränge der Doppelhelix gleichzeitig gebrochen. Die Herausforderung an die Reparaturmaschinerie besteht darin, dass es nicht möglich ist, die Sequenzinformation des komplementären Strangs zur Reparatur zu nutzen. Eine fehlerhafte Reparatur des DSBs kann zu Insertionen, Deletionen, Translokationen, Chromosomenfusionen und zum Verlust der Heterozygotie führen. Zur Beseitigung von DSBs gibt es verschiedene Reparaturmechanismen: der Mechanismus des *non-homologous end joining* (NHEJ), welcher zwar einen effizienten Mechanismus zur Behebung des Schadens darstellt, aber meist mit Veränderungen der genomischen Sequenz im Bereich des DSBs einhergeht (vgl. Abschnitt 1.2.1). Dagegen ist der Mechanismus der Homologe Rekombination, aufgrund der Verwendung homologer Sequenzen als Matrize, eine wichtige Möglichkeit zur fehlerfreien Reparatur eines DSBs (vgl. Abschnitt 1.2.3) (Puchta, 2005; Bleuyard *et al.*, 2006):

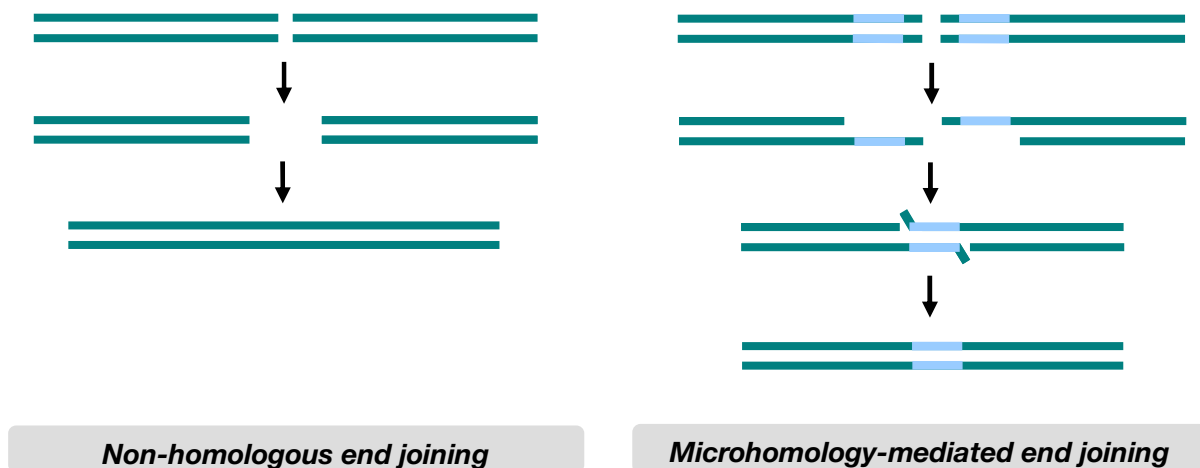
### 1.2.1 *Non-homologous end joining*

In somatischen Pflanzenzellen, wie auch in anderen mehrzelligen Eukaryoten ist der Hauptweg zur Reparatur von DSBs die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ; vgl. Abbildung 1.1) (Salomon und Puchta 1998; Kirik *et al.*, 2000). Das NHEJ stellt einen schnellen und effizienten Reparaturmechanismus dar, welcher in allen Organismen konserviert ist (Critchlow und Jackson 1998; Lieber *et al.*, 2003; Hefferin und Tomkinson, 2005; Burma *et al.*, 2006; Shuman und Glickman, 2007). Die Genauigkeit dieses Reparaturwegs ist gerade ausreichend für glatte Brüche, die ohne weitere Prozessierung ligiert werden können und keine Veränderungen in der Sequenz zur Folge haben (Gorbunova und Levy, 1997; Salomon und Puchta, 1998; van Heemst *et al.*, 2004). Je nach Beschaffenheit der zu ligierenden Enden kann die Reparatur über NHEJ aber auch zu kleineren oder größeren Deletionen und in selteneren Fällen zu Insertionen führen (Salomon und Puchta, 2005; Shrivastav *et al.*, 2008). Bei letzteren werden beliebige, nicht homologe Sequenzen in die Bruchstelle eingefügt (Smider und Chu, 1997; Puchta, 1999). Durch die möglichen Veränderungen in der genomischen Sequenz, wird direkter Einfluss auf die Genomevolution genommen (Kirik *et al.*, 2000; Puchta, 2005).

Der Mechanismus des NHEJ in Säugern wird durch die Erkennung der freien Enden des DSBs und die Anlagerung des konservierten Heterodimers KU70/KU80 eingeleitet. Durch die Bindung von KU70/KU80 wird die Degradation der DNA verhindert (Mimori und Hardin, 1986; Lieber *et al.*, 1997; Lieber, 2010) Der sogenannte KU-Komplex rekrutiert die DNA-abhängigen Serin/Threonin-Proteinkinase (DNA-PKcs) als katalytische Untereinheit, die wiederum durch Phosphorylierung weitere Proteine des NHEJ-Mechanismus an den DSB rekrutiert. Die Exonuklease ARTEMIS prozessiert nicht direkt ligierbare Enden, indem sie ssDNA-Überhänge entfernt oder Hairpin-Strukturen auflöst (Moshous *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002). Das XRCC4/DNA-Ligase IV-Heterodimer ligiert die beiden Enden, sobald die DNA-PKcs durch Autophosphorylierung von der DNA dissoziiert ist (Grawunder *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 2007).

Über Sequenzhomologien konnten einige Homologe der am Mechanismus des NHEJ beteiligten Proteine ebenfalls in Pflanzen und Hefe identifiziert werden. Die Funktion der in Pflanzen nicht vorhandenen DNA-PKcs und der Exonuklease ARTEMIS wird wahrscheinlich durch den MRN-Komplex (MRE11, RAD50, NBS1; beziehungsweise MRX-Komplex mit Xrs2 in *S. cerevisiae*) übernommen.

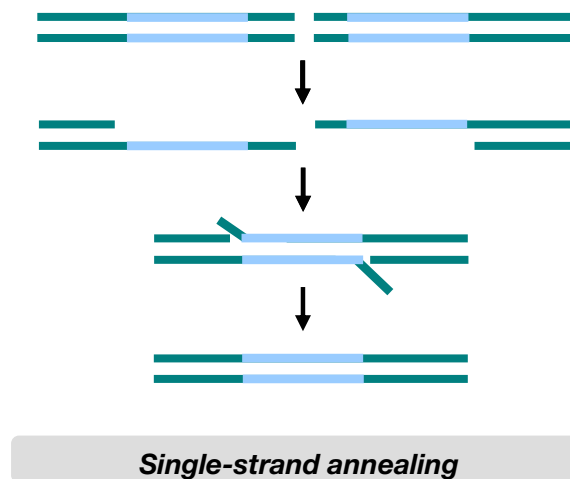
Ein KU70/KU80-unabhängiger, alternativer NHEJ-Mechanismus ist das sogenannte *microhomology-mediated end joining* (MMEJ; vgl. Abbildung 1.1) (McVey und Lee, 2008). Hier hybridisieren die beiden Enden des DSB über kurze homologe Bereiche (4 nt bis 6 nt). Die dafür benötigten freien 3'-Einzelstrangüberhänge werden durch Resektion der 5'-Enden des DSBs generiert (Lee und Lee, 2007) und die überstehenden nicht homologen Bereiche nukleolytisch abgebaut (Ma *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2008).



**Abb. 1.1: Mechanismus der nicht-homologen Endverknüpfung und der Mikrohomologie-abhängigen Endverknüpfung.** Während des *Non-homologous end joining* werden die DNA-Enden prozessiert und anschließend über die XRCC4/DNA-Ligase IV ligiert. Beim *Microhomology-mediated end joining* werden durch Resektion der 5'-Enden freie 3'-Einzelstrangbereiche generiert, die über Mikrohomologien (4 nt bis 6 nt) hybridisieren können. Überstehende, nicht-homologe Bereiche werden nukleolytisch abgebaut.

### 1.2.2 *Single-strand-annealing*

Befinden sich auf beiden Seiten des DSBs längere direkte Sequenzwiederholungen, kann der Mechanismus des SSA genutzt werden (vgl. Abbildung 1.2) (Lin *et al.*, 1984). Es können aber ebenfalls homologe Sequenzbereiche auf unterschiedlichen Chromosomen genutzt werden, sofern zwei DSBs vorliegen. In diesem Fall würde der SSA-Mechanismus zu einer reziproken Translokation führen (Pacher *et al.*, 2007). Der Vorgang des SSA ähnelt dem Prinzip des MMEJ sehr, allerdings unterscheiden sie sich wesentlich in den beteiligten Proteinen und der Länge des benötigten homologen Sequenzbereichs beidseitig des DSBs (vgl. Abbildung 1.1). Die extensive 5'-3' Resektion erfolgt in Hefe durch die Exonuklease 1 (ScExo1) oder mit Hilfe der RecQ Helikase ScSgs1 in Zusammenarbeit mit der Endonuklease ScDna2 (Bae *et al.*, 1998; Mimitou und Symington, 2008; Zhu *et al.*, 2008). Im Anschluss an die Resektion wird der entstandene 3'-Einzelstrangbereich mit dem Einzelstrangbinde-Protein RPA (*replication protein A*) ummantelt und die Hybridisierung der homologen Sequenzbereiche durch RAD52 ermöglicht (Wu *et al.*, 2006). Nachdem nicht-homologe Überhänge entfernt und vorhandene Lücken über Reparatursynthese aufgefüllt wurden, kann das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA ligiert werden. Ähnlich dem NHEJ wird auch der SSA-Reparaturweg zu den nicht-konservativen Reparaturmechanismen gezählt, da sowohl die Bereiche zwischen den wiederkehrenden Sequenzen, als auch eine der beiden Sequenzwiederholungen immer verloren gehen (Siebert und Puchta, 2002).

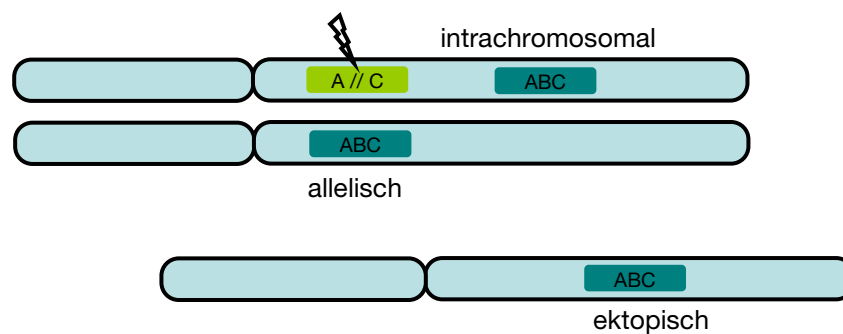


**Abb. 1.2: Mechanismus des *single-strand annealing* (SSA).** Bei längeren homologen Sequenzbereichen kann der DSB mit Hilfe des SSA-Mechanismus repariert werden. Die homologen Sequenzbereiche können im Anschluss an eine extensive 5'-3' Resektion hybridisieren. Nach dem vorhandenen nicht-homologen Überhängen nukleolytisch abgebaut wurden, erfolgt das Auffüllen und Verschließen der Lücken über Reparatursynthese und Ligaseaktivität.



### 1.2.3 Somatische homologe Rekombination

Die Verwendung vorhandener Homologien im Genom spielt in der konservativen Reparatur von DSBs über HR auch eine entscheidende Rolle. Da die Basenabfolge durch die Nutzung homologer Sequenzinformationen erhalten werden, führt die HR zu einer fehlerfreien Reparatur des DSBs. Die homologen Sequenzbereiche die als Matrize genutzt werden, können von unterschiedlichen Positionen des Genoms stammen (vgl. Abbildung 1.3) (Inbar *et al.*, 2000). Vorzugsweise wird die homologe Sequenz des Schwesterchromatids verwendet, welches während der späten S-Phase und der G2-Phase des Zellzyklus in unmittelbarer Nähe vorliegt (Kadyk und Hartwell, 1992; Dronkert *et al.*, 2000; Gonzalez-Barrera *et al.*, 2003). Es ist ebenfalls möglich, DSBs über allelische Rekombination mit der Sequenz des homologen Chromosoms zu reparieren (Gisler *et al.*, 2002). Des Weiteren können intrachromosomal vorliegende homologe Bereiche oder auch ektopische Sequenzen zur Reparatur herangezogen werden (Shalev und Levy, 1997; Inbar und Kupiec, 1999; Puchta, 1999; Aylon und Kupiec, 2000; Puchta *et al.*, 2005).



**Abb. 1.3: Intrachromosomale, allelische und ektopische Rekombination.** Zur Reparatur des DSBs können Sequenzen verschiedener Positionen im Genom verwendet werden. Bevorzugt wird die homologe Sequenz des Schwesterchromatids (nicht gezeigt) verwendet. Es ist aber auch möglich, den DSB mit der allelischen Sequenz des homologen Chromosoms, mit intrachromosomalen homologen Sequenzbereichen oder einer ektopischen Sequenz zu reparieren (Nach Puchta, 2005; verändert).

#### 1.2.3.1 Initiation der homologen Rekombination

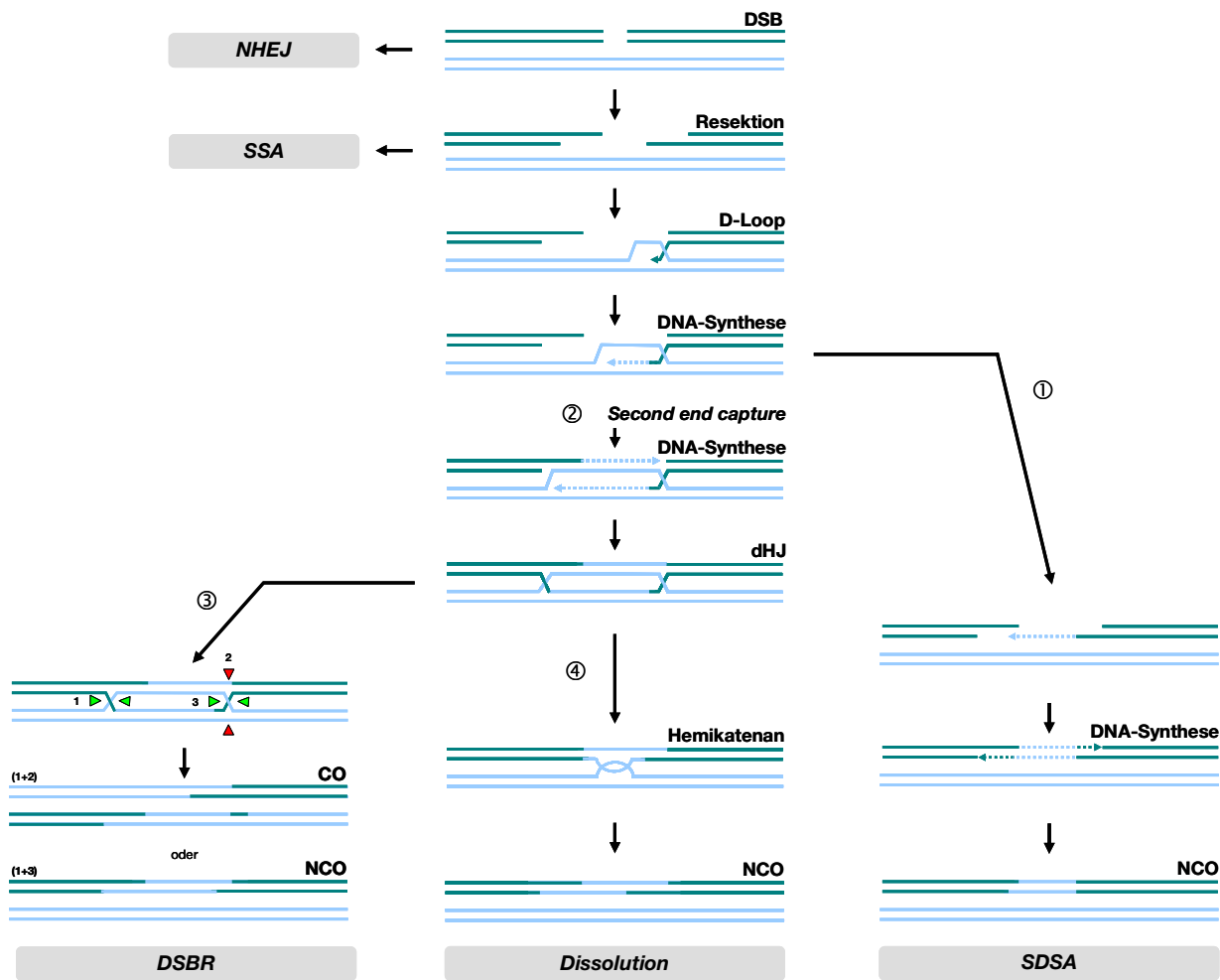
Die homologe Rekombination lässt sich in mehrere Reparaturmechanismen unterteilen, die Initiation verläuft jedoch immer gleich. Zunächst werden längere Einzelstrangbereiche durch Resektion der 5'-Enden mit Hilfe des MRN-Komplexes und der Endonuklease AtCOM1 beziehungsweise den homologen Proteinen des MRX-Komplexes und ScSae2 in *S. cerevisiae* generiert (Uanschou *et al.*, 2007; Mimitou und Symington, 2009).

Die weitere extensive Resektion über mehrere Kilobasen kann durch zwei parallele Wege erfolgen: In Hefe beispielsweise kann die Prozessierung der DNA-Enden zum einen durch die Exonuklease 1 (ScExo1) stattfinden, deren Aktivität durch die Anwesenheit der RecQ-Helikase ScSgs1 stimuliert wird (Eid *et al.*, 2010). Zum anderen durch die Endonuklease ScDna2 in Zusammenarbeit mit ScSgs1. Durch die Helikase wird das Entwinden der dsDNA beschleunigt

und die Einzelstrangbereiche für ScDna2 zugänglich gemacht. Die Endonuklease schneidet am Übergang von einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA und setzt so größere ssDNA-Bereiche frei (Bae *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2008; Bernstein und Rothstein, 2009; Langerak und Russell, 2011). *In vitro* Studien belegen die stimulierende Wirkung des MRX-Komplexes in *S. cerevisiae*, in dessen Anwesenheit die Resektionsgeschwindigkeit von ScSgs1/ScDna2 auf das zwei- bis vierfache erhöht wird (Cejka *et al.*, 2010). In Säugern konnte gezeigt werden, dass auch HsBLM, das menschliche Homolog zu ScSgs1, an der extensive 5'-3' Resektion beteiligt ist. HsBLM stimuliert die Aktivität von HsEXO1 und ist essentiell für die Resektionsreaktion mit HsDNA2 (Gravel *et al.*, 2008; Nimonkar *et al.*, 2008; 2011). Der resultierende 3'-Einzelstrangbereich wird zunächst mit dem heterotrimeren RPA ummantelt und so der Abbau der ssDNA und die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert. In einem weiteren Schritt wird RPA durch die Rekombinase RAD51 ersetzt (Shinohara *et al.*, 1992; Sung, 1994; Symington, 2002). Die Verdrängung von RPA von der ssDNA wird durch das Protein BRCA2 (in Pflanzen und Säugern) beziehungsweise Rad52 in *S. cerevisiae* gefördert und so die Beladung der ssDNA durch ATP-gebundenes RAD51 in polymerisierter Form ermöglicht (Sung, 1997; New *et al.*, 1998). Das so entstandene helikal gewundene RAD51-ssDNA-Filament vermittelt die Suche nach homologen Sequenzbereichen im Genom, ebenso wie die Invasion und Paarung des Einzelstrangs mit dem homologen doppelsträngigen Donormolekül. Durch die Verdrängung des zweiten Strangs des Donormoleküls entsteht eine Heteroduplex-Struktur, der sogenannte *displacement loop* (D-Loop). Der invadierte Einzelstrang kann nun am freien 3'-Ende durch eine DNA-Polymerase verlängert werden, wobei der komplementäre Donorstrang als Matrize dient. Nach dem *revised model* (Allers und Lichten, 2001; Hunter und Kleckner, 2001) ist der D-Loop der Verzweigungspunkt für vorerst zwei unterschiedliche Möglichkeiten der weiteren Prozessierung in der HR und stellt so ein wichtiges Rekombinationsintermediat dar.

### 1.2.3.2 *Synthesis-dependent strand-annealing*

Eine Möglichkeit ist der Mechanismus des *synthesis-dependent strand-annealing* (SDSA). Nach Nassif *et al.* (1994) wird der verlängerte invadierte DNA-Strang wieder aus dem D-Loop herausgelöst, und geht Basenpaarungen mit dem freien 3'-Einzelstrangüberhang des gegenüberliegenden DSB-Endes ein (vgl. Abbildung 1.4). Dies ist möglich, sobald eine komplementäre Sequenz im zweiten freien Ende des DSBs vorhanden ist. Anschließend werden Einzelstranglücken durch DNA-Synthese aufgefüllt und das Rückgrat der DNA ligiert. Da die Sequenzinformation zum Schließen der Einzelstranglücken aus dem homologen Partnermolekül stammt, führt dieser Mechanismus zur Genkonversion, dem nicht-reziproken Austausch genetischer Information (Nicht-Crossover Produkt). Die Bildung von Crossover-Produkten ist über diesen Mechanismus nicht möglich.



**Abb. 1.4: Mechanismen der Reparatur von DSBs durch homologe Rekombination.** Die Reparatur eines DSBs kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Sowohl der nicht-konservative Mechanismus des *non-homologous end-joining* (NHEJ), als auch der semikonservative *single-strand annealing* Mechanismus (SSA) führen zur Reparatur des Schadens, ohne Erhaltung der ursprünglichen Sequenz. Die konservative homologe Rekombination (HR) ermöglicht die Reparatur des DSBs ohne Sequenzveränderungen. Zu Beginn der HR werden durch die initiale 5' Resektion, 3'-Einzelstrangbereiche generiert. Die Stranginvasion eines dieser freien 3'-Enden in die homologe Sequenz des Donormoleküls führt zur Bildung des *displacement loop* (D-Loop). Ab hier untergliedert sich die HR in den *double strand break repair* (DSBR) Mechanismus und das *synthesis-dependent strand-annealing* (SDSA). Im SDSA-Weg ①, wird der eingedrungene Strang nach der Verlängerung mit Hilfe des Donorstrangs, aus dem D-Loop herausgelöst und lagert sich komplementär an das zweite Ende des DSBs an, sobald eine Homologie vorhanden ist. Nach dem Schließen der Lücke, wird die Reparatur mit Bildung eines NCO (Non-Crossover) abgeschlossen. Nach dem DSBR Modell wird der D-Loop solange verlängert, bis der verdrängte Strang des Donormoleküls komplementär zum zweiten freien Ende des DSBs ist und Basenpaarungen mit diesem eingehen kann (*second end capture*) ②. Die anschließende Reparatursynthese und Ligation führt zur Bildung einer doppelten Holliday junction (dHJ). Nach dem klassischen DSBR-Mechanismus (*Resolution*) ③ wird diese durch HJ-Resolvasen aufgelöst. Abhängig von der Orientierung der Schnittstellen entstehen CO-Produkte (1 und 2) oder NCO-Produkte (1 und 3) Die Auflösung der dHJ über den Weg der Dissolution ④, führt ausschließlich zu NCO-Produkten. Dabei werden die beiden HJs mit Hilfe einer RecQ-Helikase aufeinander zugeschoben (*branch migration*), die entstandene Hemikatanen-Struktur wird durch eine Typ IA Topoisomerase und RMI1 aufgelöst.

### 1.2.3.3 *Double strand break repair*

Bei der Reparatur eines DSBs nach dem klassischen Doppelstrangbruchreparaturmodell (*double strand break repair*, DSBR) nach Szostak (Szostak *et al.*, 1983) erfolgt die Erweiterung des D-Loops, indem das 3'-Ende des eingedrungenen Stranges durch DNA-Synthese soweit verlängert wird, bis der verdrängte Strang des Donormoleküls komplementär zum zweiten freien 3'-Ende des DSBs ist (vgl. Abbildung 1.4). Während des sogenannten *second end capture*, wird der verdrängte Donorstrang mit dem zweiten freien 3'-Einzelstrangüberhang gebunden. Für diesen Vorgang wird ebenfalls die Beteiligung von RAD51 diskutiert (Sugiyama *et al.*, 2006). Der verdrängte Strang des D-Loops dient anschließend als Matrize für die Reparatursynthese des zweiten DSB-Endes. Durch die Ligation der DNA-Stränge entsteht ein weiterer Kreuzungspunkt. Die entstandene Struktur wird als doppelte Holliday Junction (dHJ) bezeichnet (Szostak *et al.*, 1983) und stellt ein weiteres zentrales Rekombinationsintermediat dar, dessen Auflösung sowohl über den Mechanismus der *Resolution* des DSBR, als auch über den alternativen *Dissolution* Mechanismus möglich ist.

Dem klassischen DSBR-Modell nach Szostak *et al.* (1983) zu folge, wird die dHJ durch die enzymatische Aktivität spezifischer Endonukleasen (HJ-Resolvasen) an den Verzweigungspunkten symmetrisch geschnitten und aufgelöst. Dieser Prozess wird als *Resolution* bezeichnet und kann durch verschiedene HJ-Resolvasen bewerkstelligt werden (Übersicht in Schwartz und Heyer, 2011), wobei abhängig von der bevorzugten Schnittachse der Resolvasen sowohl Crossover (Cobb and Bjergbaek, 2006), als auch Non-Crossover Produkte (NCO) entstehen können. HJ-Resolvasen sind typischerweise strukturspezifische Endonukleasen, die als Homodimer an die HJ binden. Werden zwei symmetrische Schnitte am Verzweigungspunkt der HJ eingefügt, wird die HJ in zwei Duplexe aufgelöst. Das DNA-Rückgrat des jeweils unterbrochenen Stranges der beiden Duplexe, lässt sich direkt mit Hilfe von DNA-Ligasen verknüpfen (Osman *et al.*, 2009).

#### **Der Endonukleasekomplex RuvABC und die Resolvase RuvA**

In *E. coli* wird die Prozessierung der dHJ durch die Proteine RuvA, RuvB und der Endonuklease RuvC vermittelt. Die erste *ruv*-Mutante und der *ruv* Locus wurden erstmals in einem genetischen Screen von Mutanten identifiziert, die hypersensitiv auf UV-Strahlung reagierten (Otsuji *et al.*, 1974). Das *ruv*-Operon kodiert für drei Gene, deren Beteiligung am selben Reparaturmechanismus vermutet wurde, da die Mutationen der einzelnen Gene zu ähnlichen phänotypischen Merkmalen führten.

Das strukturspezifische DNA-Bindeprotein RuvA bindet in Form von zwei Tetrameren beidseitig an die HJ und rekrutiert RuvB an diese verzweigte DNA-Struktur. RuvB, das in Abwesenheit von RuvA nur eine geringe DNA-Bindeaffinität aufweist, lagert sich in Anwesenheit von RuvA als zwei ringförmige Hexamere an die HJ an. RuvB gehört zur Familie der AAA<sup>+</sup> ATPasen (*ATPase Associated with various cellular Activities*) und vermittelt als Motorprotein im

RuvAB-HJ-Komplex die *branch migration* der HJ (Iwasaki *et al.*, 1989a, 1989b; Tsaneva *et al.*, 1993; Putnam *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass RuvC in Abwesenheit von RuvAB nicht zur *Resolution* von HJs in der Lage ist (Mandal *et al.*, 1993; Sharples *et al.*, 1994). Daher wird angenommen, dass der RuvABC-Komplex es der sequenzspezifischen Endonuklease RuvC erst ermöglicht, durch *branch migration* die DNA nach der benötigten Konsensussequenz (5'-A/T↓TT<sup>G</sup>/C-3') abzusuchen (Davies und West, 1998; van Gool *et al.*, 1999). Erst die Vervollständigung des Komplexes durch ein RuvC-Dimer und die korrekte Positionierung der beiden aktiven Zentren des RuvC-Dimers führt zur effizienten Auflösung der HJ über zwei symmetrisch angeordnete Schnitte (Dunderdale *et al.*, 1991; Shah *et al.*, 1997; Lilley und White, 2001; Osman *et al.*, 2009).

Die Resolvase RusA bildet ähnlich zu RuvC ein Homodimer aus, das sowohl strukturspezifisch, als auch sequenzspezifisch an verzweigte DNA-Substrate und Duplex-DNA bindet. Die Konsensussequenz von RusA ist nicht vollständig aufgeklärt, allerdings werden Schnittstellen 5' von CC-Dinukleotiden bevorzugt (Chan *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu RuvC interagiert die RusA-Resolvase nicht direkt mit einem Motorprotein, welches das *branch migration* vermittelt. RusA aus *E. coli* zeigt 95% Sequenzidentität zu RusA aus dem Genom des Prophagen DLP12. Die geringe Transkription von RusA kann durch die Integration der transposablen Insertionssequenzen (IS) IS2 beziehungsweise IS10 upstream der codierenden Sequenz angeregt werden. Diese Insertionen treten in *ruv*-defizienten Stämmen spontan auf und unterdrücken die Defekte in der Rekombination und auch die erhöhte UV-Sensitivität (Mahdi *et al.*, 1996). Die vollständige Aufhebung der *ruv* Defekte ist abhängig von der Aktivität von RecG, welches wahrscheinlich benötigt wird um die HJ durch *branch migration* an eine passende Schnittsequenz für RusA zu verschieben (Mahdi *et al.*, 1996; Sharples *et al.*, 1994; Sharples *et al.*, 1999).

### **Der Endonukleasekomplex SLX1/SLX4**

Die Identifikation des Slx1/Slx4 Komplexes in Hefe erfolgte durch einen genetischen Screen nach Proteinen die für die Lebensfähigkeit eines *sgs1*-defizienten *S. cerevisiae* Stamms benötigt wurden. In dieser Studie konnten insgesamt sechs *SLX*-Gene (*synthetic lethal of unknown function*) lokalisiert werden, die zwar für die Lebensfähigkeit in Abwesenheit von Sgs1 oder Top3, aber nicht in Wildtyp-Zellen benötigt wurden (Mullen *et al.*, 2001). Diese sechs Slx-Proteine bilden heterodimere Komplexe (Slx1-Slx4, Slx2-Slx3, Slx5-Slx8) die zum Teil bereits bekannten Endonuklease Komplexen zugeordnet werden konnten. So entspricht der Komplex aus Slx3/Slx2 dem Komplex Mus81/Mms4 in *S. cerevisiae* beziehungsweise Mus81/Eme1 in *S. pombe* (Boddy *et al.*, 2001; Mullen *et al.*, 2001; Kaliraman *et al.*, 2001).

Anhand von *in silico* Analysen konnte Slx1 bereits über die N-terminale *UvrC-intron-type* Endonuklease Domäne (URI) der URI-YIG Endonuklease Familie zugeordnet werden. Zu dieser Familie der Endonukleasen gehört auch *EcUvrC*, das als Endonuklease an der NER

beteiligt ist (Van Houten und Snowden, 1993; Dunin-Horkawicz *et al.*, 2006). Die ebenfalls nachgewiesenen C-terminale PHD-Zinkfinger Domäne scheint essentiell für die Nukleaseaktivität von ScSlx1 zu sein (Fricke und Brill, 2003). Im Gegensatz dazu konnten in ScSlx4 keine offensichtlichen katalytischen Motive identifiziert werden. Ebenso war die Suche nach dem mammalischen SLX4 Homolog anhand der Aminosäuresequenz von ScSlx4 erfolglos. In Pilzen konnte allerdings eine konservierte Region im C-Terminus identifiziert werden, die mit einer SAP-Domäne (*after SAF-A/B, Acinus and PIAS*) und einem HtH-Motiv (*Helix turn Helix*) zwei mögliche DNA-Bindedomänen enthält, weshalb angenommen wurde, dass SLX4 für die direkte Interaktion mit dem DNA-Substrat verantwortlich ist (Aravind *et al.*, 2000a; Coulon *et al.*, 2004). Erst 2009 konnten anhand des konservierten C-Terminus SLX4 Homologe in Säugern identifiziert werden, darunter auch das menschliche Homolog BTBD12 beziehungsweise SLX4. Durch Immunopräzipitations- und *Two-Hybrid*-Studien konnte sowohl die Interaktion mit dem menschliche SLX1 Homolog, als auch mit weiter Interaktionspartner von SLX4 gezeigt werden. Dazu gehörten unter anderem die bereits bekannten strukturspezifischen Endonukleasekomplexe XPF-ERCC1 und MUS81-EME1, deren enzymatische Aktivität wie auch die von SLX1 durch SLX4 stimuliert wird (Fekairi *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009). Für CeSLX1 konnte in neusten Studien gezeigt werden, dass es zwar nicht essentiell für die Bildung von COs über die Auflösung von HJs ist aber an der Regulation der CO-Verteilung beteiligt ist. Es wird angenommen, dass CeSLX1 die Verteilung auf die terminalen Bereiche der Chromosomen verschiebt, indem es Reparatur der DSBs über NCO erzeugende Mechanismen fördert (Saito *et al.*, 2012). Für den Komplex aus CeSLX1 und CeHIM18 (SLX4 Homolog in *C. elegans*) konnte wie bereits für Slx1/Slx4 aus *S. cerevisiae* oder für HsSLX1/SLX4 eine strukturspezifische Nukleaseaktivität gegenüber verschiedenen verzweigten DNA-Strukturen nachgewiesen werden. Allerdings werden HJ-Substrate von CeSLX1/HIM18 und ScSlx1/Slx4 in asymmetrischer Weise umgesetzt, so dass die entstandenen Produkte nicht direkt ligierbar sind (Fricke und Brill, 2003; Saito *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu prozessiert der SLX1/SLX4 Komplex aus dem Menschen das HJ-Substrat durch symmetrisch angeordnete Schnitte zu Produkte die direkt kompatibel für die Ligation sind, wie es ebenfalls für die HJ-Resolvasen *EcRuvC* und *HsGEN1* bekannt ist (Dunderdale *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 2008; Svendsen *et al.*, 2009).

### **Der Endonukleasekomplex MUS81/EME1**

Das Protein Mus81 (*MMS and UV sensitive 81*) wurde erstmals in einem *Yeast-Two-Hybrid*-Screen anhand der Interaktion mit dem Rekombinationsreparaturprotein Rad54 in *S. cerevisiae* und der Replikations-Checkpoint-Kinase Cds1 in *S. pombe* identifiziert werden (Boddy *et al.*, 2000; Interthal und Heyer, 2000). Die Endonuklease MUS81 gehört zur XPF/MUS81-Proteinfamilie der Nukleasen und bildet zusammen mit seinem Interaktionspartner EME1 (Mms4 in *S. cerevisiae*) einen funktionellen Endonukleasekomplex, welcher nur in

heterodimerer Form enzymatisch aktiv ist. Der MUS81/EME1-Endonukleasekomplex ist im Zellkern lokalisiert (Fu und Xiao, 2003; Higgins *et al.*, 2008) und in den Nukleoli angehäuft (Gao *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex eine Vielzahl von verschiedenen, häufig überkreuzten DNA-Strukturen asymmetrisch schneiden kann und eine wichtige Funktion in der Reparatur von blockierten und kollabierten Replikationsgabeln, aber auch in der Prozessierung von Rekombinationsintermediaten in Säugern, Hefe und auch *Drosophila* übernimmt. Darum zeigen *mus81* beziehungsweise *eme1* Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien wie MMC, MMS und UV-Strahlung (Interthal und Heyer, 2000; Boddy *et al.*, 2001; Abraham *et al.*, 2003; Odagiri *et al.*, 2003; McPherson *et al.*, 2004; Hanada *et al.*, 2006). Die MUS81 Endonuklease ist in Eukaryoten stark konserviert und so auch deren Funktion in der somatischen Auflösung von Rekombinationsintermediaten wie 3'-Flaps, D-Loops und HJs mit Einzelstrangbruch. Intakte HJs sind aber nur ein schlecht umgesetztes Substrat in *S. pombe*, *S. cerevisiae* und in Säugern. In der Meiose allerdings weicht die Bedeutung von MUS81 zwischen den einzelnen Organismen voneinander ab. Während der Verlust von Mus81 in *S. pombe* zu nicht überlebensfähigen Sporen führt, sind Mus81 Mutanten in *S. cerevisiae* und Mammalia in ihrer Fertilität nur eingeschränkt. Aber im Gegensatz zu *S. pombe* existieren in *S. cerevisiae* und im Menschen weitere Mechanismen zur Auflösung von Rekombinationsintermediaten zu COs (MSH4/MSH5-Komplex) und zur Prozessierung von dHJs durch HsGEN1 (beziehungsweise Yen1 in *S. cerevisiae*) (de los Santos *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Whitby, 2005; Holloway *et al.*, 2008; Ip *et al.*, 2008).

In *A. thaliana* wurde ein funktionelles MUS81-Homolog identifiziert, dessen Mutation wie auch in Hefe zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien wie MMC, MMS und Cisplatin führt (Hartung *et al.*, 2006). Des Weiteren sind *AtMUS81* Mutanten fertil, haben aber eine eingeschränkte Pollenvitalität und einen geringeren Prozentsatz an COs in der Meiose (Berchowitz *et al.*, 2007). Mutationen der Endonuklease *AtMUS81* und der RECQ-Helikase *AtRECQ4A* in *A. thaliana* oder deren Homologe in *S. cerevisiae* und *S. pombe* führen zu einer synthetischen Letalität, was darauf schließen lässt, dass diese Proteine an parallelen Mechanismen zur Prozessierung von Rekombinationsintermediaten beteiligt sind (Boddy *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2001; Hartung *et al.*, 2006). Für den Komplexpartner EME1 konnten im Genom von *A. thaliana* zwei Homologe in unmittelbarer Nähe zueinander identifiziert werden. Beide Proteine, *AtEME1A* und *AtEME1B*, zeigen eine Identität von 62,7% auf Proteinebene und werden ähnlich stark transkribiert, allerdings in geringerem Maße als *AtMUS81* (Hartung *et al.*, 2006; Geuting *et al.*, 2009). Innerhalb der Sequenz von *AtEME1A* wurde eine alternative Spleißstelle gefunden, welche zu einem 3 Aminosäuren längeren Protein führt. Für *AtEME1B* konnten insgesamt 5 Positionen für alternatives Spleißen identifiziert werden, die jeweils in einem vorgezogenen Stoppcodon resultieren und somit nicht funktionelle Transkripte erzeugen. Anhand biochemischer Analysen konnte beiden Komplexen *AtMUS81/EME1A* und *AtMUS81/EME1B* die endonukleolytische Aktivität zur Prozessierung

von 3'-Flaps, genickten HJs und in geringerem Maße auch die Prozessierung von intakten HJs nachgewiesen werden. Im Schnittmuster für HJs mit Einzelstrangbruch und 3'-Flaps unterscheiden sich die Komplexe AtMUS81/EME1A und AtMUS81/EME1B nicht. In Bezug auf intakte HJs werden von AtMUS81/EME1A symmetrische Schnittpositionen bevorzugt (Geuting *et al.*, 2009).

### Die Resolvase GEN1

Die Suche nach der eukaryotischen HJ-Resolvase, die HJs analog zu *EcRuvC* prozessiert, erwies sich als schwierig (Dunderdale *et al.*, 1991; Iwasaki *et al.*, 1991). Denn auch wenn HJ-Resolvasen aus unterschiedlichen Organismen bezüglich ihrer Funktion konserviert sind, so zeigen sie auf Proteinebene nur eine geringe Sequenzidentität (Aravind *et al.*, 2000b). Bereits 1994 wurde eine HJ-Resolvase-Aktivität in Extrakten aus mammalischen Zellen nachgewiesen. Allerdings konnte das verantwortliche Protein aufgrund der geringen Menge auch in weiteren Versuchen nicht identifiziert werden (Hyde *et al.*, 1994; Constantinou *et al.*, 2002). Im Jahre 2008 gelang es *HsGEN1* anhand der HJ-Resolvase-Aktivität in einem Extrakt aus 200 Litern HeLa-Zellen zuzuordnen. Die selbe Gruppe konnte ebenfalls das Ortholog zu *HsGEN1* in *S. cerevisiae* (*ScYen1*) identifizieren (Ip *et al.*, 2008). Sowohl für *ScYen1*, als auch für *HsGEN1* konnte durch Ip *et al.* eine Prozessierung von HJs analog zum RuvC-Mechanismus nachgewiesen werden. *HsGEN1* bindet, wie auch *EcRuvC*, spezifisch in dimerisierter Form an die HJ und fügt zwei symmetrische Schnitte an den kontinuierlichen Strängen der HJ ein. Zusätzlich zur RuvC-ähnlichen Resolvase-Aktivität ist *HsGEN1* (*XPG-like endonuclease*) eine monomerische 5'-Flap Endonuklease, weshalb die Zuordnung zur RAD2/XPG-Nuklease-Familie erfolgte. Die RAD2/XPG-Nuklease Familie besteht aus monomerischen 5'-Flap Endonukleasen mit einem charakteristischen N-terminalen XPG-Nuklease Motiv, einem inneren XPG-Nuklease-Motiv und einem Helix-Hairpin-Helix-Motiv. Bis zur Identifizierung der ssDNA-Endonuklease *OsSEND-1* (*Single-strand DNA Endonuclease I*) gab es in Eukaryoten 3 Klassen von RAD2/XPG-Nukleasen. In verschiedenen Screens nach Endonukleasen der RAD2/XPG-Familie konnten die Nukleasen *OsSEND-1*, *OsGEN-L* und *DmGEN1* identifiziert werden (Furukawa *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2004; Moritoh *et al.*, 2005). *DmGEN1*, *HsGEN1*, *OsSEND-1*, *OsGEN-L* und *ScYen1* zeigte zwar Ähnlichkeiten zu den Vertretern der Klasse 1 (XPG), Klasse 2 (FEN-1) und Klasse 3 (HEX1/EXO1), konnten aber aufgrund von Größenunterschieden und der Anordnung der beiden XPG-Nuklease-Motiven (-N und -I) keiner dieser 3 Klassen eindeutig zugewiesen werden und bilden daher die neue Klasse 4 der RAD2/XPG-Nukleasen (Furukawa *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2004; Moritoh *et al.*, 2005; Ip *et al.*, 2008)

Anhand der Sequenzidentität mit *OsSEND-1* und *OsGEN-L* konnten ebenfalls putative Homologe in *A. thaliana* (*AtGEN1*: At1g01880; *AtSEND1*: At3g48900) identifiziert werden. Die bisherige Charakterisierung der Einzelmutanten von *AtGEN1* und *AtSEND1*, bezüglich ihrer



Rolle in der DNA-Reparatur von DNA-Schäden verursacht durch verschiedene Genotoxine (Bleomycin, Cisplatin, Camptothecin, Hydroxyurea, Mitomycin C und Methylmethansulfonat) ergab keine näheren Erkenntnisse (Klimesch, 2012).

#### 1.2.3.5 *Dissolution*

Die Auflösung der dHJ, als zentrales Intermediat der DSBR, über den alternativen *Dissolution* Weg ist im Gegensatz zur *Resolution* unabhängig von Resolvasen. Dieser Mechanismus wurde 1988 von Thaler und Stahl (Thaler und Stahl, 1988) als alternatives Reparaturmodell zur Prozessierung von dHJ ohne die endonukleolytische Aktivität von Resolvasen postuliert. Hierbei wird aus der dHJ ein Hemikatenan generiert, dessen Auflösung ausschließlich zu NCO-Produkten führt (vgl. Abbildung 1.4). Die Bildung der Hemikatenan-Struktur erfolgt durch die Aktivität einer RecQ-Helikase, welche die beiden Kreuzungspunkte der dHJ unter ATP-Verbrauch aufeinander zu bewegt (*branch migration*). Die über jeweils einen Einzelstrang zusammenhängenden DNA-Doppelstränge werden anschließend durch eine Typ IA Topoisomerase voneinander getrennt, indem ein Strang geschnitten und der intakte Strang durch diese Lücke hindurchgeführt wird (Wu und Hickson, 2003). Für die zwei Phasen der *Dissolution* wird neben der RecQ-Helikase und der Typ IA Topoisomerase noch das Strukturprotein RMI1 benötigt. Diese Proteine werden im sogenannten RTR-Komplex (RecQ-Helikase / Topoisomerase / RMI1) zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Funktion als auch die Komponenten des RTR-Komplexes evolutionär stark konserviert sind (siehe Abschnitt 1.3) (Chang *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005; Hartung *et al.*, 2007, 2008; Übersicht in Mankouri und Hickson, 2007). In Pflanzen konnte zusätzlich zur Funktion in der somatischen Rekombination noch eine wichtige Rolle des *Dissolution* Mechanismus in der meiotischen Rekombination gezeigt werden (Chelysheva *et al.*, 2008; Hartung *et al.*, 2008).

#### 1.2.4 Rekombination in der Meiose

Die meiotische Rekombination ist zum einen essentiell für die korrekte Segregation der Chromosomen während der Meiose und zum anderen wichtig für die Erzeugung genetischer Diversität. Die Meiose umfasst im Anschluss an die prämeiotische Replikation zwei aufeinanderfolgende Kernteilungen, an deren Ende aus einer diploiden Zelle vier haploide Gameten entstanden sind (Übersicht in Harrison *et al.*, 2010). Der diploide Zustand wird anschließend durch die Verschmelzung der parental Gameten zur Zygote wieder hergestellt. Die Erzeugung genetischer Vielfalt wird durch homologe Rekombination während der Bildung der 4 haploiden Gameten und der zufälligen Vermischung parental Gameten ermöglicht (Andersen und Sekelsky, 2010; Osman *et al.*, 2011).

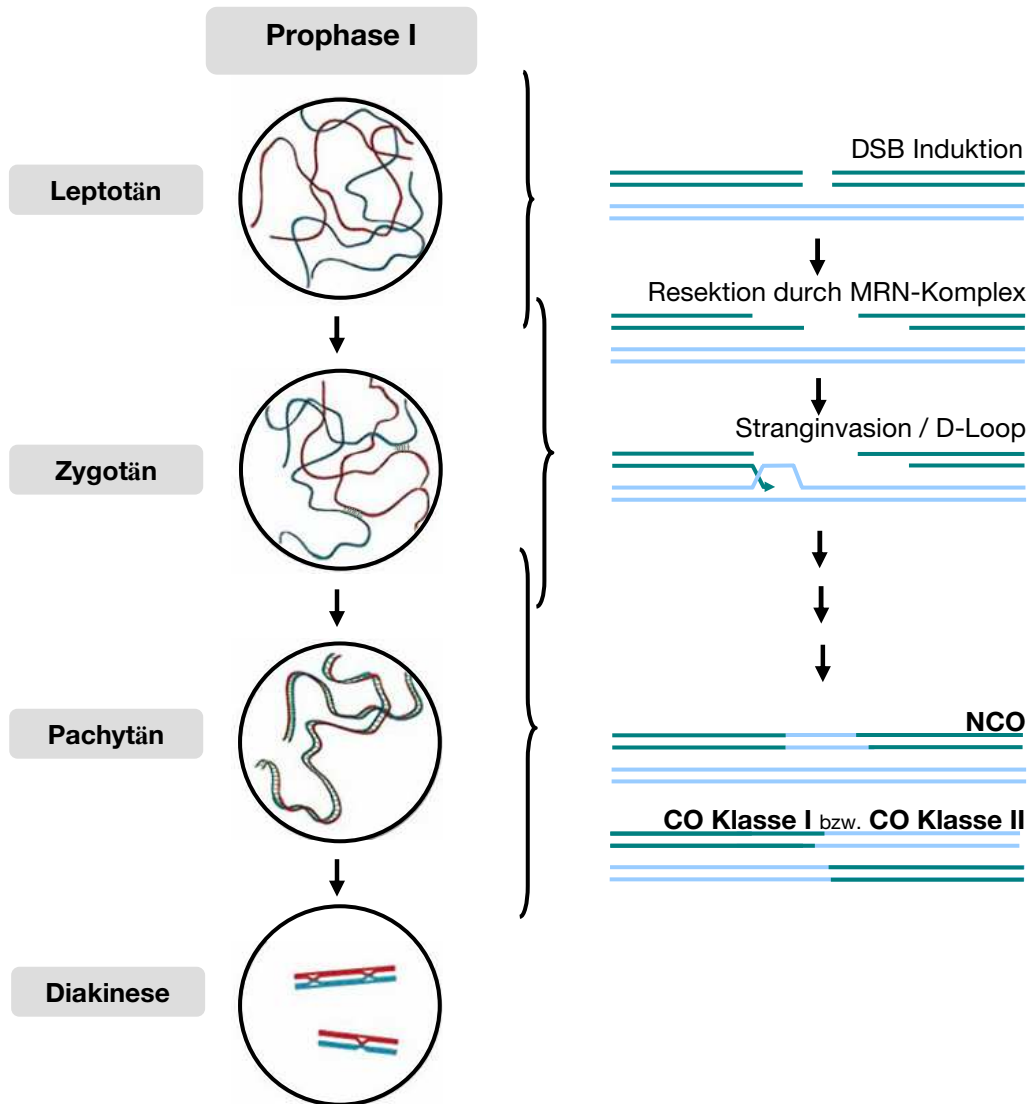
Zu Beginn der Prophase I, dem Leptotän, bilden sich die Chromosomenachsen entlang der Chromatiden aus, wodurch die Kondensation der Chromosomen eingeleitet wird (Kleckner, 2006). Die Schwesterchromatiden werden während der ersten meiotischen Teilung über Kohäsine zusammengehalten (Nasmyth und Haering, 2005). Parallel zur Ausbildung der Chromosomenachsen, wird die meiotische homologe Rekombination durch die Induktion von DSBs initiiert (vgl. Abbildung 1.5). Die DSBs werden durch das evolutionär konservierte Protein SPO11 (*sporulation protein 11*) eingefügt, welches das Homolog zur archaebakteriellen Untereinheit A der Typ II Topoisomerase Top6 darstellt (Bergerat *et al.*, 1997; Keeney *et al.*, 1997). Im Zygotän beginnt die Synapsis, durch die Bildung des Synaptonemalen Komplexes (*synaptonemal complex*, SC) werden die homologen Chromosomen entlang ihrer Chromosomenachsen gepaart (Page und Hawley, 2004). Parallel zur Synapsis erfolgt die Homologiesuche durch die resektierten Enden des DSBs, um die Reparatur über die Sequenz des homologen Chromosoms zu ermöglichen. Für *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass für die vollständigen Synapsis DMC1 für die Paarung der homologen Zentromerregionen und RAD51 sowie dessen Paraloge RAD51C und XRCC3 für die Paarung der Chromosomenarme benötigt werden (Da Ines *et al.*, 2012). Bereits im anschließenden Pachytän sind sowohl die Synapsis, als auch die Vorgänge der HR abgeschlossen. Während der letzten Stadien der Prophase I, des Diplotäns und der Diakinese wird der SC wieder abgebaut und die Kondensation der homologen Chromosomen abgeschlossen. Die Synapsis der homologen Chromosomen wird zwar wieder aufgehoben aber die Stellen an denen durch Rekombination COs entstanden sind, bleiben über Chiasmata verbunden.

Nun ordnen sich die gepaarten homologen Chromosomen (Bivalente) während der Metaphase I an der Äquatorialebene an, um während der anschließenden Anaphase I zu den entgegengesetzten Polen der Zelle gezogen zu werden. Mit der Telophase I ist die erste Reifeteilung abgeschlossen. Zur Bildung der haploiden Gameten werden nun in der darauffolgenden zweiten meiotischen Teilung die Schwesterchromatiden der Chromosomen voneinander getrennt.

### 1.2.5 Proteine der meiotischen Rekombination in *A. thaliana*

Wie bereits erwähnt, wird die HR in der Meiose gewollt durch die Induktion von DSBs durch SPO11 induziert. In *A. thaliana* konnten 3 SPO11-Homologe identifiziert werden: *AtSPO11-1*, *AtSPO11-2* und *AtSPO11-3* (Hartung und Puchta, 2000, 2001). Während *AtSPO11-3* an der somatischen Endoreduplikation beteiligt ist, sind *AtSPO11-1* und *AtSPO11-2* essentiell für die Induktion der meiotischen Rekombination und den Fortgang der Meiose. Sie arbeiten wahrscheinlich in Form eines Heterodimers und sind bereits während der G2-Phase mit Chromatin assoziiert (Hartung *et al.*, 2002, 2007; Sanchez-Moran *et al.*, 2007). Nach der Induktion des Bruches bleibt SPO11 am 5'-Ende kovalent gebunden und wird erst mit der Resektion durch den MRN-Komplex und *AtCOM1* entfernt (Bleuyard *et al.*, 2004a,

Puizina *et al.*, 2004; Uanschou *et al.*, 2007; Waterworth *et al.*, 2007). Erste meiotische Defekte in *Atspo11-1* und *Atspo11-2* werden während des Pachytäns sichtbar. Durch die fehlende Synapsis der homologen Chromosomen lassen sich im Laufe des Diplotäns keine Bivalente detektieren. Während der beiden Reifeteilungen segregieren die Chromosomen ungleichmäßig, was zur Bildung von Polyaden führt (Grelon *et al.*, 2001; Staacy *et al.*, 2006; Hartung *et al.*, 2007).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der zellbiologisch aufeinanderfolgenden Stadien der meiotischen Prophase I und der parallel verlaufenden molekularen Prozesse der homologen Rekombination.** Während des Leptotäns beginnt die Kondensation der Chromosomen durch Ausbildung der Chromosomenachsen. Die Verankerung an der Kernhülle über die Telomere bleibt bestehen. Die Ausbildung des synaptomalen Komplexes (SC) beginnt im Zygotän und wird im Pachytän abgeschlossen. Die meiotische Rekombination wird durch Induktion von DSBs durch SPO11 im Leptotän initiiert. Im Anschluss an die Resektion der DSB Enden durch den MRN-Komplex erfolgt die Homologiesuche und Stranginvasion mit Hilfe von DMC1 und RAD51. Bis zur Diakinese ist der SC bereits wieder abgebaut und die DSBs wurden über HR zu *non-crossover* (NCO) oder *crossover*-Produkten prozessiert. In Bezug auf die COs wird zwischen der Klasse I (interferierend) und Klasse II (nicht interferierend) unterschieden. In der Diakinese sind die homologen Chromosomen, an den durch HR COs entstanden sind, noch sichtbar über Chiasmata verbunden (nach Mèzard *et al.*, 2007).

Zusätzlich zu *AtSPO11-1* und *AtSPO11-2* konnte den Proteine *AtPRD1*, *AtPRD2* und *AtPRD3* (*putative recombination initiation defect*) eine frühe meiotische Funktion in der Generierung von DSBs zugeordnet werden. Die Mutation von *AtPRD1*, *AtPRD2* oder *AtPRD3* führt zum Fehlen der DMC1-Foci als Marker der frühen meiotischen Rekombination. Zudem zeigt *Atprd1* einen vergleichbaren meiotischen Phänotyp wie auch *Atspo11-1* beziehungsweise *Atspo11-2* und auch die Mutation von *AtPRD1* unterdrückt wie *Atspo11-1* und *Atspo11-2* den meiotischen Phänotyp von *Atrad51* (De Muyt *et al.*, 2007, 2009).

In Hefe entfernt der MRX-Komplex entfernt durch asymmetrisch orientierte endonukleolytische Schnitte das gebundene SPO11-Heterodimer gemeinsam mit einem kurzen Oligonukleotid (Neale *et al.*, 2005). In *A. thaliana* führt sowohl die Mutation der Nuklease *AtMRE11*, als auch von *AtRAD50* führen zu schweren meiotischen Defekten. Meiozyten beider Mutanten zeigen keine Bildung von Bivalenten und schwere Chromosomenfragmentierungen. (Bleuyard *et al.*, 2004 b; Puizina *et al.*, 2004; Waterworth *et al.*, 2007). Wie auch in der somatischen HR scheint *AtCOM1* ebenfalls in der Meiose eine wichtige Funktion in der initialen Resektion der DSB-Enden mit dem MRN-Komplex einzunehmen, den auch *Atcom1* zeigt einen mit *Atmre11* und *Atrad50* vergleichbaren meiotischen Phänotyp (Uanschou *et al.*, 2007). Die weitere extensive Resektion der 5'-Enden erfolgt in Hefe mit Hilfe der Exonuklease 1 (Exo1) (Zakharyevich *et al.*, 2010). Für das duplizierte Genpaar *AtEXO1A* und *AtEXO1B* konnte diese Funktion bisher nicht nachgewiesen werden (Knoll, 2011; Kazada *et al.*, 2012).

Die generierten 3'-Überhänge können nun mit Hilfe der Rekombinasen RAD51 (*radiation sensitive 51*) oder DMC1 (*disrupted meiotic cDNA 1*) in homologe Chromosomenbereiche invadieren, wobei sich die beiden Rekombinasen wahrscheinlich in der Wahl des Donormoleküls unterscheiden.

Mutanten des sowohl somatisch als auch meiotisch aktiven *AtRAD51* zeigen eine starke Chromosomenfragmentierung, es wird angenommen das durch *AtRAD51* eher homologe Bereiche der Schwesterchromatiden zur Rekombination verwendet werden (Siaud *et al.*, 2004). *AtDMC1* dagegen ist meiosespezifisch und bevorzugt wahrscheinlich das homologe Chromosom als Donormolekül. In meiotischen Zellen der *Atdmc1* Mutante ist die Segregation der homologen Chromosomen aufgrund fehlender CO-Ereignisse gestört (Couteau *et al.*, 1999). Sowohl die Suche nach homologen dsDNA-Bereichen, als auch das Eindringen des Nukleofilaments, wird in *A. thaliana* und *S. cerevisiae* durch die Proteine MND1 und HOP2 gefördert (Tsubouchi und Roeder, 2002; Domenichini *et al.*, 2006; Kerzendorfer *et al.*, 2006; Panoli *et al.*, 2006; Chi *et al.*, 2007; Pezza *et al.*, 2007).

Neuesten Untersuchungen zu folge, konnte gezeigt werden dass *AtDMC1* und *AtRAD51* jeweils an den gegenüberliegenden Enden des DSBs lokalisiert sind und die Bildung des DMC1-Nukleofilaments abhängig von ATR ist (Kurzbauer *et al.*, 2012). Nach diesem Modell soll die Stranginvasion durch *AtDMC1* in das Schwesterchromatid durch aktiviertes ASY1 im Bereich des DSB verhindert werden. Sollte die Homologiesuche durch *AtDMC1* im homologen Chromosom nicht erfolgreich sein, wird die Stranginvasion durch das RAD51-Nukleofilament in

das Schwesterchromatid als letzte Möglichkeit zur Reparatur des DSBs vorgeschlagen (Kurzbauer *et al.*, 2012). Für die meiotische HR in Hefe wird postuliert, dass Rad51 zwar direkt die Rekombination in der Mitose katalysiert aber in der Meiose nur als Hilfsprotein zur Nukleofilament-Bildung dient und nicht essentiell ist für die Stranginvasion in die homologe Sequenz durch DMC1 (Goldfarb und Lichten, 2010; Cloud *et al.*, 2012).

In *A. thaliana* konnten fünf RAD51-Paraloge (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) identifiziert werden. In Vertebraten konnten diese RAD51-Paraloge zwei Komplexen zugeordnet werden. Der CX3-Komplex besteht aus RAD51C und XRCC3, der zweite Komplex setzt sich zusammen aus RAD51B, RAD51C, RAD51D und XRCC2 (BCDX2-Komplex) (Thacker *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Masson *et al.*, 2001; Yonetani *et al.*, 2005; Osakabe *et al.*, 2002/2005; Bleuyard *et al.*, 2005; Durrant *et al.*, 2007). Von diesen sind die Komplexpartner RAD51C und XRCC3 des CX3-Komplexes durch einen sterilen Phänotyp einer Funktion in der Meiose zuzuordnen (Osakabe *et al.*, 2002; Bleuyard *et al.*, 2004 a; Bleuyard und White, 2004; Abe *et al.*, 2005; Bleuyard *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Osakabe *et al.*, 2005; Vignard *et al.*, 2007). In Meiozyten von *Atrad51C* und *Atxrcc3* sind bis Ende des Zygotäns der Prophase I keine Auffälligkeiten zu erkennen. Allerdings scheint die Ausbildung der Synapsis bis ins späte Pachytän nicht zum Abschluss gekommen zu sein, durch schwere Chromosomenfragmentierungen und auch fusionierte Chromosomen ist es nicht möglich, lebensfähige Gameten zu bilden (Abe *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Vignard *et al.*, 2007). Die auftretende Chromosomenfragmentierung in *Atrad51C* kann durch eine zusätzliche Mutation in *AtSPO11-1* unterdrückt werden. Daher ist *AtRAD51C* an der Prozessierung von DSBs beteiligt, die durch *AtSPO11-1* zu Beginn des Leptotän induziert werden. Beiden RAD51-Paralogen werden mehrere Funktionen in der meiotischen Prophase I zugeordnet. Zum einen sollen RAD51C und XRCC3 eine wichtige Funktion in der Homologiesuche übernehmen, indem sie es als Cofaktoren erleichtern RAD51 an die ssDNA des 3'-Überhangs zu bringen (Bishop *et al.*, 1998; Tarsounas *et al.*, 2004; Badie *et al.*, 2009). Zum anderen werden sowohl *AtRAD51C*, als auch *AtXRCC3* für die Paarung der Chromosomenarme und somit zur vollständigen Synapsis benötigt (Da Ines *et al.*, 2012).

In *A. thaliana* entstehen während der Meiose ungefähr zehn COs, allerdings werden durch *AtSPO11-1/AtSPO11-2* etwa 150 DSBs induziert. Die Mehrzahl der Rekombinationsintermediate, etwa  $\frac{2}{3}$ , wird wahrscheinlich über den SDSA Mechanismus zu NCOs aufgelöst und nur etwa zehn werden über die dHJ als Rekombinationsintermediat zu CO-Produkten, die für die korrekte Aufteilung der homologen Chromosomen benötigt werden (Sanchez-Moran *et al.*, 2007). Um eine korrekte Aufteilung der Chromosomen zu gewährleisten enthält in *A. thaliana* jedes der fünf Chromosomen mindestens einen CO, insgesamt sind zwischen acht und zehn COs pro Nukleus vorhanden (Higgins *et al.*, 2004). Die Auswertung der Verteilung der Crossover über die Chromosomen zeigte, dass diese nicht statistisch verteilt sind (Copenhaver

*et al.*, 2002). Die Position eines CO kann durch die Anwesenheit eines weiteren CO in unmittelbarer Nähe beeinflusst werden (Interferenz-sensitive Crossover oder COs der Klasse I), so dass die Entstehung weiterer COs in unmittelbarer Nähe unterbunden wird und die CO-Homöostase erhalten bleibt (Hillers, 2004; Jones und Franklin, 2006). Die Positionen von COs der Klasse II, wird weder von Interferenz gelenkt, noch ist zwangsweise ein CO pro Chromosom vorhanden. Die Entstehung von Interferenz-insensitiven Crossovern konnte in *A. thaliana* durch das Ausschalten von Schlüsselproteinen des Klasse I-Crossover-Mechanismus bestätigt werden (Copenhaver *et al.*, 2002; de los Santos *et al.*, 2003; Higgins *et al.*, 2004). In *A. thaliana* ist die Entstehung von COs der Klasse I oder der Klasse II abhängig von den Heterodimeren MSH4/MSH5 und MUS81/EME1 (Übersicht in Osman *et al.*, 2011). Der Komplex aus MSH4/MSH5 stellt das eukaryotische Homolog zu den bakteriellen Proteinen MutS und MutL dar (Ross-McDonald und Roeder, 1994). Dem Heterodimer konnte eine wichtige Rolle in der CO-Bildung durch eine stabilisierende Funktion in Bezug auf die zwei invadierten Stränge nach dem *second end capture* nachgewiesen werden (Nishant *et al.*, 2010). Des Weiteren wurde die Entstehung von Interferenz-sensitiven Crossover-Produkten mit der Bildung von MSH4-Foci assoziiert (de los Santos *et al.*, 2003; Higgins *et al.*, 2008). Dagegen ist das Heterodimer MUS81/EME1 an der Bildung von Klasse II COs beteiligt (de los Santos *et al.*, 2003). In *A. thaliana* wurden anhand der MSH4-Foci etwa 50 Rekombinationsintermediate identifiziert, die zu COs der Klasse I aufgelöst werden könnten. Es entstehen aber nur ungefähr zehn Crossover. Daher beschreiben die MSH4-Foci den Zustand nach der Entscheidung zur DSBR aber vor der Entscheidung zur *Resolution* oder *Dissolution*. So ist nach der Ausbildung der dHJ noch eine späte Entscheidung zur Bildung von NCOs über den *Dissolution*-Mechanismus mit Hilfe des RTR-Komplexes möglich.

### 1.3 Der RTR-Komplex

Der RTR-Komplex ist in Eukaryoten stark konserviert und setzt sich aus einer RecQ-Helikase (ScSgs1/HsBLM), einer Typ IA Topoisomerase (ScTop3/Hs TOP3 $\alpha$ ) und dem Strukturprotein RMI1 zusammen (vgl. Abschnitt 1.3.1 und Abschnitt 1.3.2) (Chang *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005; Übersicht in Mankouri und Hickson, 2007). Die Beteiligung von RMI2 als neuen, vierten Komplexpartner, wurde bisher nur für den menschlichen RTR-Komplex gezeigt (vgl. Abschnitt 1.3.3) (Singh *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). Mit Hilfe von Sequenzanalysen konnten putative RMI2-Homologe für weitere tierische und pflanzliche Organismen bestimmt werden, aber nicht in Hefe (Xu *et al.*, 2008). In *A. thaliana* besteht der RTR-Komplex aus der

RecQ-Helikase *AtRECQ4A*, der Topoisomerase *AtTOP3 $\alpha$*  und *AtRMI1* (Hartung *et al.*, 2007, 2008). Die Interaktion des Komplexes mit *AtRMI2* konnte noch nicht gezeigt werden.

Die dHJ, als zentrales Intermediat der DSBR, wird über die zwei Phasen der *Dissolution*-Reaktion aufgelöst: Zuerst wird ein Hemikatenan durch die Aktivität der Helikase (*branch migration*) gebildet, welches im nächsten Schritt durch die Typ IA Topoisomerase zu einem NCO-Produkt aufgelöst wird. RMI1 hat hierbei keine katalytische Funktion, es wird zur Stabilisierung des Komplexes und zur Stimulation der *Dissolution* benötigt (Wu *et al.*, 2006; Raynard *et al.*, 2006; Cejka *et al.*, 2010). Ursprünglich wurde angenommen, RMI1 würde die *Dissolution*-Reaktion stimulieren, indem es den gesamten Komplex an die DNA bringt. Das ist aber eher unwahrscheinlich, da die Prozessierung der dHJ durch RecQ-Helikase auch ohne die Anwesenheit von RMI1 möglich ist (Cejka *et al.*, 2010).

Im Hinblick auf die Funktion des RTR-Komplexes bei der Auflösung von Rekombinationsintermediaten über den *Dissolution*-Mechanismus, spielt der Komplex eine wichtige Rolle in der Unterdrückung von CO-Produkten, da die Auflösung der dHJ über den *Dissolution* Weg ausschließlich zu NCO-Produkten führt (Wu und Hickson, 2003; Wu *et al.*, 2005; Raynard *et al.*, 2006; Chen und Brill, 2007). Neben klassischen DSBs können beispielsweise auch replikationsassoziierte DNA-Schäden prozessiert werden.

Die Beteiligung des RTR-Komplexes an der Reparatur meiotischer Rekombinationsintermediate wird durch die Phänotypen einiger RTR-Mutanten in unterschiedlichen Organismen bestätigt. Sowohl der Ausfall der Topoisomerase als auch der Ausfall von RMI1/Rmi1 führen in *S. cerevisiae* und in *A. thaliana* zu einer eingeschränkten Fertilität beziehungsweise zur vollständigen Sterilität, aufgrund eines Rekombinations-abhängigen Meiosearrests (Watt *et al.*, 1995; Gangloff *et al.*, 1999; Miyajima *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005; Chelysheva *et al.*, 2008; Hartung *et al.*, 2008). Der sterile Phänotyp belegt die essentielle Funktion des RTR-Komplexes in *A. thaliana*. Untersuchungen an Pollenmutterzellen von *A. thaliana* zeigen Chromosomenfragmentierungen und Chromatinbrücken zwischen den homologen Chromosomen der Anaphase I. Stadien der Meiose II konnten nicht gefunden werden, was auf einen Abbruch der Meiose zum Ende der ersten Reifeteilung, aufgrund der nicht prozessierten Hemikatenan-Strukturen hinweist (Chelysheva *et al.*, 2008; Hartung *et al.*, 2008). Wird zusätzlich zu *ScTop3* auch *ScSgs1* mutiert, kann der meiotische *Sctop3*-Phänotyp partiell aufgehoben werden (Gangloff *et al.*, 1994, 1999). Wird zusätzlich zu *Attop3 $\alpha$*  noch *AtRECQ4A* mutiert, wird zwar der letale Phänotyp der *Attop3 $\alpha$*  Mutante aufgehoben, nicht aber die Sterilität. (Hartung *et al.*, 2007). Das lässt annehmen, dass *AtRECQ4A*, als funktionelles Homolog zu *HsBLM* und *ScSgs1* in somatischen Zellen, keine oder nur eine redundante Funktion in der meiotischen Auflösung von Rekombinationsintermediaten durch den RTR-Komplex übernimmt. Wobei eine meiotische Funktion unabhängig des RTR-Komplexes nicht ausgeschlossen ist, da für *Atrecq4A*-Mutanten ebenfalls eine reduzierte Fertilität festgestellt wurde. Bei der Untersuchung von Meiosestadien

aus Pollenmutterzellen wurden Chromatinbrücken zwischen den Telomeren nicht homologer Chromosomen festgestellt (Higgins *et al.*, 2011).

### 1.3.1 Topoisomerase und Helikase des RTR-Komplexes

Die ersten Komplexpartner des RTR-Komplexes wurden bereits 1994 in *S. cerevisiae* identifiziert. Der Phänotyp der *top3* Mutante umfasste ein verlangsamtes Wachstum, eine erhöhte Frequenz an homologer Rekombination zwischen repetitiven Sequenzen, eine beeinträchtigte Segregation der Chromosomen sowie eine ausbleibende Sporulation. Durch eine zusätzliche Mutation der einzigen RecQ-Helikase in *S. cerevisiae*, *ScSgs1* (*slow growth suppressor 1*), konnten sowohl der Wachstumsdefekt als auch die erhöhte Genominstabilität der Typ IA Topoisomerase Mutante unterdrückt werden. Daraus schloss man, dass *ScSGS1* epistatisch zu *ScTOP3* ist. Da auch der meiotische Phänotyp partiell durch *Scsgs1* aufgehoben wird, wurde eine Interaktion der beiden Proteine in der Meiose angenommen. Man postulierte, dass das von *ScSgs1* gebildete toxische DNA-Intermediat durch *ScTop3* prozessiert wird und somit auch der Fortgang der Meiose ermöglicht wird. *Sctop3* Zellen treten zwar in die Meiose ein, ebenso werden auch die ersten Schritte der Rekombination prozessiert, aber dann bricht die Meiose mit der ersten Reifeteilung ab (Gangloff *et al.*, 1994, 1999). In Hefe und auch in *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion von *AtSPO11/ScSpo11*, welches die meiotische Rekombination induziert, der Meiosearrest aufgehoben werden kann (Gangloff *et al.*, 1999; Hartung *et al.*, 2008).

Sowohl die direkte Interaktion von *ScTop3* und *ScSgs1* über den N-Terminus von *ScSgs1* (Bennett *et al.*, 2000; Fricke *et al.*, 2001; Ui *et al.*, 2001; Onodera *et al.*, 2002), als auch die direkte Proteininteraktion der menschlichen Homologe *in vivo* und *in vitro*, konnte nachgewiesen werden (Johnson *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000). Im Unterschied zu *ScSgs1* enthält *HsBLM* je eine *TOP3α* Interaktionsdomäne im N- und C-Terminus (Wu *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2001). Über die Expression verschiedener Deletionskonstrukte fanden Hu *et al.* (2001) heraus, dass die N-terminale Interaktionsdomäne wichtig für die korrekte Lokalisierung von *HsTOP3α* und die Unterdrückung von Schwesterchromatidaustauschen (*sister chromatid exchange*, SCEs) ist.

### 1.3.2 RMI1 des RTR-Komplexes

Der dritte Komplexpartner *RMI1* (*RecQ-mediated genome instability 1*) wurde erstmals 2003 als Bestandteil verschiedener *HsBLM*-Komplexe beschrieben. Die Bezeichnung erfolgte anfangs noch nach der RecQ-Helikase im Menschen als *Bloom associated protein of 75 kD* (BLAP75) (Meetei *et al.*, 2003). Sowohl die Funktion zur Komplexstabilisierung und Förderung der Dissolution über eine direkte Proteininteraktion ist für *RMI1* als Bestandteil des



RTR-Komplexes in Eukaryoten stark konserviert (Yin *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 2005; Raynard *et al.*, 2006; Bussen *et al.*, 2007; Chen und Brill, 2007). Daher ist es nicht verwunderlich, dass der Ausfall von RMI1, ebenso wie die Mutation der anderen beschriebenen Komplexpartner, unter anderem zu einer erhöhten Rekombinationsrate im Vergleich zum Wildtyp führt (Yin *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2005; Hartung *et al.*, 2008).

Anhand von *in silico* Analysen konnten für RMI1 drei konservierte Domänen für verschiedene Organismen aus Vertebraten und Pflanzen bestimmt werden. Am N-Terminus von RMI1 liegt eine sogenannte DUF1767-Domäne (*domain of unknown function*), darauf folgt die Oligonukleotid- und Oligosaccharid bindende OB-fold Domäne 1 und am C-Terminus die OB-fold Domäne 2. Nur Hefe besitzt ein verkürztes RMI1-Homolog ohne die C-terminale OB-fold Domäne 2 (Xu *et al.*, 2008). Es wird angenommen dass die DUF1767-Domäne eine korrekte Proteinfaltung vermittelt. Über die genaue Funktion dieser Domäne ist noch nicht viel bekannt, allerdings sind DUF Domänen meistens N-terminal zu einer OB-fold Domäne zu finden, wie es auch für RMI1 der Fall ist. Sequenzvergleiche ergaben eine Ähnlichkeit der DUF1767 aus *HsRMI1* zur RuvA Domäne III aus *Mycobacterium tuberculosis*. Diese Domäne ist für die Interaktion zu *MtRuvB* verantwortlich, welches die HJ *branch migration* vermittelt (Nishino *et al.*, 1998; Prabu *et al.*, 2006; Ashton *et al.*, 2011). Die Interaktion zwischen *HsRMI1*, der RecQ-Helikase und der Typ IA Topoisomerase wird über die OB-fold Domäne 1 vermittelt, welche essentiell für die dHJ-Dissolution Reaktion ist (Yin *et al.*, 2005; Raynard *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Diese OB-fold Domäne zeigt Ähnlichkeit zur *wedge* Domäne der bakteriellen Helikase RecG. Es wird angenommen dass die *wedge* Domäne für die Bindung und Entwindung verzweigter DNA-Strukturen verantwortlich ist (Briggs *et al.*, 2005). Für die C-terminale OB-fold Domäne 2 wird eine Interaktion mit RMI2 im Menschen beschrieben. Wie bereits erwähnt, besitzt das verkürzte RMI1 Homolog aus *S. cerevisiae* keine C-terminale OB-fold Domäne 2, allerdings konnte auch kein RMI2 Homolog identifiziert werden, welches die OB-fold Domäne 2 als Interaktionsdomäne benötigen würde. (Xu *et al.*, 2008)

### 1.3.3 RMI2 des RTR-Komplexes

Erst 2008 konnte *HsRMI2* (*RecQ-mediated genome instability 2* bzw. BLAP18, *bloom associated protein of 18 kD*) in zwei unabhängigen Studien als vierter und wesentlicher Bestandteil des RTR-Komplexes im Menschen identifiziert werden (Singh *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu RMI1 ist RMI2 zwar in Vertebraten und Pflanzen vorhanden, nicht aber in Hefe. *HsRMI2* ist deutlich kleiner als *HsRMI1* und besteht fast ausschließlich aus einer Oligosaccharid- bzw. Oligonukleotid-Bindedomäne (OB-fold Domäne 3), welche die Interaktion mit der OB-fold Domäne 2 von *HsRMI1* ermöglicht. Durch Sequenzvergleiche konnte die OB-fold Domäne 2 von *HsRMI1* und die OB-fold Domäne 3 den OB-fold Domänen von RPA2 (D) und RPA1 (C) (*Replication protein A*) zugeordnet werden. Die OB-fold Domäne D ist weniger an der ssDNA-Bindeaktivität von RPA beteiligt, aber entscheidend für die Protein-

Protein-Interaktion Die Ähnlichkeit der OB-fold Domänen des RMI-Subkomplex und der RPA-Untereinheiten lassen darauf schließen, dass die Interaktion und auch die Funktion der OB-fold Domänen in RMI denen von RPA entsprechen (Fanning *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008). *HsRMI1* und *HsRMI2* bilden zusammen den RMI-Subkomplex, der für die Stabilisierung des RTR-Komplex benötigt wird, eine ssDNA-Bindeaktivität konnte für diesen Komplex nicht nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 2008). Wie bereits für RMI1 gezeigt werden konnte, führt auch der Verlust von *HsRMI2* zur Destabilisierung des Komplexes, zu einer erhöhten MMS-Sensitivität und zu einer erhöhten Rate von SCEs. Die stimulierende Funktion von *HsRMI1* auf die dHJ-Dissolution Aktivität ist ebenfalls abhängig von *HsRMI2* (Xu *et al.*, 2008; Hoadley *et al.*, 2010).

Auch in *A. thaliana* existiert ein RMI2-Homolog, das mit dem strukturellen Aufbau von *HsRMI2* vergleichbar ist und ebenfalls die konservierten Proteinbereiche enthält, für die in *HsRMI2* eine wichtige Funktion in der Interaktion mit *HsRMI1* gezeigt werden konnte (Hoadley *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Schröpfer, 2012). Die Mutation von *Atrmi2* führt ähnlich der Mutationen von *Atrmi4A*, *Atrmi1* und *Attop3a* zu einer leicht erhöhten Frequenz spontaner Rekombinationsereignisse. Die weitere Charakterisierung der *Atrmi2*-Mutante ergab jedoch keine erhöhte Sensitivität gegenüber MMS und Cisplatin und auch keine meiotischen Defekte, wie sie für *Atrmi1* nachgewiesen wurden (Hartung *et al.*, 2007, 2008; Schröpfer, 2012).

#### 1.4 Ziele dieser Arbeit

Durch bisherige Untersuchungen der Mutanten *Atrmi1-1* und *Atrmi1-2* konnte die Beteiligung von *AtRMI1* an der Unterdrückung der somatischen homologen Rekombination festgestellt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *AtRMI1* essentiell für die meiotische Rekombination ist. Abhängig von der jeweiligen Mutante führt die Mutation von *RMI1* zur eingeschränkten Fertilität (*Atrmi1-2*) oder zur Sterilität (*Atrmi1-1*) der Pflanzen. Dies beruht auf schwerwiegenden Chromosomenfragmentierungen in der Anaphase I aufgrund nicht aufgelöster Rekombinationsintermediate und resultiert im Abbruch der Meiose zum Ende der Telophase I.

In dieser Arbeit sollten verschiedene *RMI1*-Konstrukte zur Expression von *AtRMI1* beziehungsweise modifizierter *RMI1*-Deletionsvarianten unter der Kontrolle des natürlichen Promotors und Terminators erstellt werden. Durch die stabile Transformation des *RMI1*-Konstruktes mit der vollständigen cDNA-Sequenz von *AtRMI1* sollte der hyperrekombinative und hypersensitive Phänotyp sowie der meiotische Defekt der *Atrmi1* Mutanten komplementiert werden. Dadurch sollte gezeigt werden, dass die genannten phänotypischen Eigenschaften der *rmi1* Mutanten allein auf die Mutation im Genlocus *AtRMI1* zurückzuführen sind und dass durch die Expression des rekombinant *RMI1*-Konstrukts ein Protein entsteht, welches die Funktionen von *AtRMI1* übernehmen kann. Mit den verschiedenen *RMI1*-Deletionskonstrukten, in denen jeweils eine der drei konservierten Domänen oder beide

N-terminalen Domänen entfernt wurden, sollten ebenfalls stabil transformierte Mutantenlinien etabliert werden. Diese Linien sollten auf die Funktionalität der *RMI1*-Deletionsvarianten in Bezug auf die Komplementierung der beiden *rmi1* Mutanten getestet werden, um die Relevanz der einzelnen Domänen bezüglich der Funktion von RMI1 einordnen zu können.

Ein weiteres Ziel war die Aufhebung des sterilen *Atrmi1-1* Phänotyps durch die Expression verschiedener Resolvasen beziehungsweise Endonukleasen. Hierzu sollten Konstrukte zur Expression von *AtGEN1*, *AtMUS81/AtEME1A*, *ScSLX1/ScSLX4*, *EcRuvABC* und *EcRusA* unter der Kontrolle von zwei unterschiedlichen meiotisch exprimierenden Promotoren erstellt und in die Mutante *Atrmi1-1* transformiert werden. Die rekombinanten Proteine und Proteinkomplexe sollte die bevorzugte Auflösung von Rekombinationsintermediaten über den *Resolution* Mechanismus bewirken, um dadurch die Anzahl der meiotischen COs zu erhöhen und die Entstehung von toxischen Rekombinationsintermediaten in der *Atrmi1-1* Mutante zu umgehen. Zur weiteren Charakterisierung der *rmi1* Mutanten und zur genaueren Einordnung der Funktion von *AtRMI1* in der DNA-Reparatur, sollte die Kreuzung von *Atrmi1-2* mit der Mutante von *AtMUS81* erfolgen, welches durch die Beteiligung an der *Resolution* ebenfalls eine wichtige Rolle in der homologen Rekombinationsreparatur spielt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 Binokulare und Mikroskope

- Binokular Stemi DV4 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)
- Binokular SZB 300 (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) mit AxioCam MR, Filtersatz 49 DAPI shift free, EC-Plan-NEOFLUAR (20x/0,5), Plan-APOCHROMAT (63x/1,4 Oil), Plan-APOCHROMAT (100x/1,4 Oil)

#### 2.1.2 Elektroporation

- Elektroporationsküvette, 2 mm Elektroden-Abstand (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Capacitance Extender Plus (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- GenePulser II mit Puls Controller Plus (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

#### 2.1.3 Heizblöcke, Schüttler, Inkubatoren

- Anzuchtschrank CU-36L4 (Percival Scientific, Inc., Perry, USA)
- Inkubationsschüttler Certomat® IS (B. Braun Biotech International, Sartorius AG, Göttingen)
- Inkubationsschüttler 3032 (GFL GmbH, Burgwedel)
- Thermoblock TDB-120 (lab4you GmbH, Berlin)
- Thermoblock Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg)
- Trockenschrank Modell UE 500 (Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach)

#### 2.1.4 Sicherheitswerkbänke und Reinraumbänke

- captair® Biocap™ RNA/DNA (Erlab D.F.S S.A.S, Köln)
- et130V Sicherheitswerkbank (Ehret GmbH und Co. KG, Emmendingen)
- NU-480 Sicherheitswerkbank (INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald)

- Reinraumbank Typ HF und KVF (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen)

### **2.1.5 Thermocycler und Zubehör für PCR**

- FlexCycler (Analytic Jena AG, Jena)
- LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Mastercycler® gradient (Eppendorf AG, Hamburg)
- MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Tpersonal Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen)
- Gel iX Imager (Geldokumentationssystem (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen; P91 Photoprinter (Mitsubishi, Irvine, USA)

### **2.1.6 Zentrifugen**

- MiniSpin®, Winkelrotor für 12 x 1,5/2,0 ml, Winkelstellung 45°, Rotorradius 6,0 cm (Eppendorf AG, Hamburg)
- neoLab-Zentrifuge mit Vortex-Funktion, Winkelrotor für 12 x 1,5/2,0 ml, Winkelstellung 45°, Rotorradius 6,0 cm (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)
- Z 233 M-2, Winkelrotor 24 x 1,5/2,0 ml, Winkelstellung 45°, Rotorradius 8,5 cm (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)
- Z 233 MK-2, Winkelrotor 24 x 1,5/2,0 ml, Winkelstellung 45°, Rotorradius 8,5 cm (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)
- Z 383 K, Winkelrotor 6 x 80 ml, Winkelstellung 38°, Rotorradius 11,5 cm (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)
- Z 383 K, Ausschwingrotor, 20 x 50 ml, Rotorradius 18,6 cm (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)

### **2.1.7 Sonstiges**

- Feinwaage AB104-S (Mettler-Toledo GmbH, Giessen)
- Digitale Analysenwaage KERN 440-47 (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern)
- Digitale Analysenwaage CS-200 (OHAUS, Nänikon, Schweiz)
- Qubit® Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- Wasseraufbereitungsanlage TKA-LAB HP (Thermo Elektron LED GmbH, Niederelbert)

## 2.2 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden über die Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Fluka AG (Buchs), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), DUCHEFA Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande) oder Merck Gruppe KGaA (Darmstadt) in der Regel in p.a. Qualität bezogen und werden nicht weiter aufgeführt.

- Agarose SeaKem® LE Agarose (Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz)
- Beef-Extrakt (GERBU Biotechnik GmbH, Wieblingen)
- dNTP Mix (jeweils 10 mM) (Fermentas Life Sciences GmbH, St. Leon-Rot)
- Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- GeneRuler™ 1kb DNA-Leiter (Fermentas Life Sciences GmbH, St. Leon-Rot)
- Hefe-Extrakt (DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande)
- Murashige & Skoog Fertigmedium mit Vitaminen und MES-Puffer (DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande)
- Pepton (DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande)
- Plant Agar (DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande)
- LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Silwet® L-77 (Gemisch aus Heptamethyltrisiloxan [84%] und Allyloxypolyethylenglykol-methylether [16 %]; (Lehle Seeds, Round Rock, Texas, USA)
- Trypton (DUCHEFA Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande)
- Vectashield Mounting Medium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Vector Labs, Peterborough, UK)
- X-GlcA ((5- Brom – 4 – chlor – 3 – indolyl –  $\beta$  - D-glucuronid) cyclohexyl-Ammoniumsalz, DUCHEFA Biochemie B.V., Harlem, Niederlande)

## 2.3 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

- Ladepuffer (6x)
  - 0,2% (w/v) Orange G
  - 0,05% (w/v) Xylencyanol
  - 10% (v/v) Glycerin
  - 60 mM EDTA
- SB-Puffer (20x)
  - 8 g/l NaOH
  - 47 g/l Borsäure
  - pH 8,0

- SB-Gele 0,9% (w/v) Agarose in 400 ml 1x SB-Puffer  
15 µl 1 % Ethidiumbromid
- TAE-Puffer (50x) 242 g/l Tris  
57,1 ml/l Eisessig  
100 ml/l 0,5 M EDTA  
pH 8,0
- TAE-Gele 0,9% (w/v) Agarose in 400 ml 1x TAE-Puffer  
15 µl 1% Ethidiumbromid

### 2.3.2 Einfache DNA-Isolierungen

- Shorty-Extraktionspuffer 0,2 M Tris/HCl (pH 9,0)  
0,4 M LiCl  
25 mM EDTA  
1% (w/v) SDS
- TE-Puffer 10 mM Tris/HCl  
1 mM EDTA  
pH 8,0

### 2.3.3 Histochemische Färbung

- Natriumphosphat-Puffer (100 mM) 17,8 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
pH 7,0 mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$
- X-GlcA-Färbelösung 1,0 ml 5% (w/v) Natriumazid (gelöst in ddH<sub>2</sub>O)  
2,5 ml 1% (w/v) X-GlcA (gelöst in Dimethylformamid)  
mit 100 mM Natriumphosphat-Puffer auf 50 ml aufgefüllt

### 2.3.4 Medien zur Anzucht für Pflanzen und Bakterien

Alle Medien wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt. Nach dem Einstellen des pH-Werts wurde für die Herstellung von Festmedien die angegebene Menge an Plant-Agar zugegeben und das Medium autoklaviert. Hitzeempfindliche Medienzusätze wie Antibiotika wurden steril filtriert und erst nach Abkühlen des Mediums auf circa 50 °C zugegeben.

- GM-Medium (Germination Medium; für *Arabidopsis thaliana*)
  - 4,9 g/l Murashige & Skoog Fertigmedium
  - 10 g/l Saccharose
  - pH 5,7 mit KOH
  - 7,6 g/l Plant-Agar für Festmedien
- LB-Medium (Lysogeny Broth Medium; für *Escherichia coli*)
  - 10 g/l Pepton
  - 5 g/l Hefe-Extrakt
  - 10 g/l NaCl
  - pH 7,0 mit NaOH
  - 17,5 g/l Plant-Agar für Festmedien
- YEB-Medium (Yeast Extract Broth Medium; für *Agrobacterium tumefaciens*)
  - 5 g/l Beef Extrakt
  - 1 g/l Hefe-Extrakt
  - 5 g/l Pepton
  - 5 g/l Saccharose
  - 493 mg/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
  - 17 g/l Plant-Agar für Festmedien

### 2.3.5 Meicytenpräparation

- Fixierlösung
  - 25 ml 100 % Essigsäure
  - 75 ml 99,5 % Ethanol
- Citratpuffer (0,01 M)
  - 4,45 ml 0,1 M Natriumcitrat
  - 5,55 ml 0,1 M Zitronensäure
  - mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen
  - pH 4,5
- Verdau-Stammlösung
  - 1% (w/v) Cellulase (C1794)
  - 1% (w/v) Pectolyase (P5936)
  - gelöst in 0,01 M Citratpuffer
  - bei -20 °C gelagert



### 2.3.6 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

- Infiltrationsmedium
  - 2 g Murashige & Skoog Fertigmedium
  - 40 g Saccharose
  - 3,4 µl 0,1% Benzylaminopurin (BAP)
  - mit ddH<sub>2</sub>O auf 800 ml auffüllen
  - pH 5,7 mit KOH
  - 800 µl Acetosyringon (100 mg/ml in Dimethylsulfoxid)
  - 300 µl Silwet® L-77

## 2.4 Medienzusätze und Genotoxine

### 2.4.1 Medienzusätze

Verwendete Medienzusätze wie Antibiotika, Herbizide oder Hormone wurden in ddH<sub>2</sub>O beziehungsweise Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und anschließend steril filtriert (PVDF-Filter mit 0,22 µm Porengröße). In Tabelle 2.1 sind die Konzentrationen der Stammlösungen und der verwendeten Konzentrationen für die verschiedenen Organismen aufgeführt.

**Tabelle 2.1: Medienzusätze.** Angegeben sind die verwendeten Endkonzentrationen für die jeweiligen Organismen und die Konzentrationen der Stammlösungen (gelöst in H<sub>2</sub>O <sup>(1)</sup> oder in DMSO <sup>(2)</sup>).

Zusatz	Stammlösung	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. thaliana</i>
Benzylaminopurin (BAP)	1 mg/ml <sup>(1)</sup>			5 mg/l
Acetosyringon	100 mg/ml <sup>(2)</sup>		100 mg/l	
Cefotaxim	250 mg/ml <sup>(1)</sup>			500 mg/l
Gentamycin	100 mg/ml <sup>(1)</sup>	20 mg/l	20 mg/l	
Spectinomycin	100 mg/ml <sup>(1)</sup>	100 mg/l	100 mg/l	
Rifampicin	100 mg/ml <sup>(2)</sup>	100 mg/l	100 mg/l	
DL-Phosphinothricin (PPT)	20 mg/ml <sup>(1)</sup>			6 mg/l

### 2.4.2 Genotoxinlösungen

Die verwendeten Genotoxine wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst und steril filtriert (PVDF-Filter mit 0,22 µm Porengröße). In Tabelle 2.2 sind die Konzentrationen der Stocklösungen und der verwendeten Konzentrationen für Sensitivitätstests als auch für Rekombinationstests mit *A. thaliana* angegeben.

**Tabelle 2.2: Genotoxine.** Angegeben sind die verwendeten Genotoxine und Konzentration der Stammlösung.

Genotoxin	Stammlösung
<i>cis</i> -Diamin-dichlorid-platin (II) (Cisplatin)	1 mM
Methylmethansulfonat (MMS)	100%

## 2.5 Enzyme

### 2.5.1 Polymerasen

- DreamTaq™ DNA Polymerase (5 U/μl, 10x Amplifikationspuffer, Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot)
- Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl, 10x Amplifikationspuffer, Biomaster GmbH, Windeck)
- Taq-DNA-Polymerase mit einer Prozessivität von circa 1 kb/min (Herstellung am eigenen Lehrstuhl), 10x Amplifikationspuffer (160 mM Ammoniumsulfat, 670 mM Tris, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Tween 20, pH 8,8 mit HCl)
- F-530S/L Phusion™-High-Fidelity-DNA-Polymerase (2 U/μl, F518S/L Phusion™ 5x-Amplifikationspuffer HF & GC, Finnzymes, Vantaa, Finnland)
- TaKaRa ExTaq-DNA-Polymerase (5 U/μl, 10x Amplifikationspuffer, TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan)

### 2.5.2 Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden ausschließlich von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen und entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

- *AvrII*, *PacI*, *I-SceI*, *Pi-PspI*, *Bsu36I*, *NcoI*

### 2.5.3 Weitere Enzyme

- Antarctic Phosphatase mit 10x Phosphatase-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- Cellulase aus *Trichoderma viride* (C1794, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- DNase I RNase-frei mit RDD-Puffer (Qiagen, Hilden)
- Pectolyase aus *Aspergillus japonicus* (P5936, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Ribonuklease A (RNase A) (SERVA Electrophoresis, Heidelberg)

- T4 DNA-Ligase mit 10x Ligase-Puffer (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot)

## 2.6 Plasmide

Alle Plasmide dieser Arbeit basieren auf dem binären Vektor pPZP201, der sowohl zur Vermehrung in *E. coli* als auch in *A. tumefaciens* geeignet ist (Hajdukiewicz *et al.*, 1994). Zur Bakterienselektion befindet sich auf dem Plasmid eine Streptomycin-/Spectinomycin-Resistenzkassette. Der Vektor pPZP201 wurde in einer vorangegangenen Arbeit in zwei aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten modifiziert (Bonnet, 2009). Zuerst wurde in die vorhandene *Multiple Cloning Site* (MCS) der *BAR open reading frame* unter Kontrolle des 35S Promotor und Terminator des Blumenkohl-Mosaik-Virus eingefügt (pSBO-1). Dieser vermittelt eine PPT-Resistenz und wurde zur Selektion transformierter Pflanzen verwendet. Im weiteren Verlauf wurde die ursprüngliche MCS von 8 auf 17 Restriktionsschnittstellen erweitert (pSBO-2). Die MCS befindet sich innerhalb der Bordersequenzen, die für den Transformationsmechanismus von *A. tumefaciens* notwendig sind. Die zur Transformation essentiellen *Vir*-Gene liegen auf dem bereits im verwendeten Agrobakterien-Stamm vorhandenen Ti-Plasmid (GV3101::pMP90; Koncz und Schell, 1986). Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und klonierten Plasmide sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Vektoren, die im Laufe dieser Arbeit kloniert wurden, sind schematisch in Kapitel 3.1.1 und 3.21 dargestellt.

**Tabelle 2.3: Plasmide.** Die aufgeführten Plasmide dienen entweder als Ausgangsvektor <sup>(1)</sup> für verschiedene Klonierungen, zur Amplifikation einzelner Gene <sup>(2)</sup> oder als Endvektor zur Transformation von *A. thaliana* <sup>(3)</sup>.

Plasmid	Quelle
pSBO-2 <sup>(1)</sup>	Bonnet, 2009
pGEM-Teasy-RMI1 <sup>(2)</sup>	Knoll, 2007
pRMI1 <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
pRMI1ΔDUF <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
pRMI1ΔOB1 <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
pRMI1ΔOB2 <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
pRMI1ΔDUFΔOB1 <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
pETDuet1-StrepII PS-AtGEN1 <sup>(2)</sup>	Dipl. biol. Markus Bauknecht
p(DMC1-P)-GEN1 <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
p(RMI2-P)-GEN1 <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
pSBO-17 <sup>(2)</sup>	Bonnet, 2009
p(DMC1-P1)	diese Arbeit
p(DMC1-P1+2)	diese Arbeit
p(DMC1-P)-MUS81/EME1A <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
p(RMI2-P)-MUS81/EME1A <sup>(3)</sup>	diese Arbeit

Tabelle 2.3: Fortsetzung.

Plasmid	Quelle
p(DMC1-P)-ScSLX1/SLX4 <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
p(RMI2-P)-ScSLX1/SLX4 <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
p(DMC1-P)-EcRusA <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
p(RMI2-P)-EcRusA <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
p(DMC1-P)-EcRuvABC <sup>(3)</sup>	diese Arbeit
p(RMI2-P)-EcRuvABC <sup>(3)</sup>	diese Arbeit

## 2.7 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden über die Firmen biomers.net GmbH (Ulm), Invitrogen Life Technologies (Darmstadt) und metabion international (Martinsried) bezogen und sind im Anhang (Kapitel 6, Tabelle 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5) mit Sequenzangaben aufgeführt.

## 2.8 Kits

Die Verwendung der angegebenen Kits erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Jegliche Abweichungen vom Herstellerprotokoll werden in den einzelnen Abschnitten zur Anwendung des Kits angegeben.

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim)
- In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit (Clontech, Mountain View, USA)
- In-Fusion<sup>®</sup> HD EcoDry<sup>™</sup> Cloning Kit (Clontech, Mountain View, USA)
- iQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green I Supermix (Bio-Rad, München)
- RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot)
- RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- peqGold Plasmid Miniprep Kit I (C-Linie; PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen)
- Qubit<sup>®</sup> dsDNA Broad Range Assay Kit (Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- Qubit<sup>®</sup> dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- Qubit<sup>®</sup> RNA Broad Range Assay Kit (Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt)

## 2.9 Organismen und transgene Linien

### 2.9.1 *Agrobacterium tumefaciens* - GV3101::pMP90

Zur Agrobakterien-vermittelten Transformation von *A. thaliana* wurde der Agrobakterien-Stamm GV3101::pMP90 (pTiC58 $\Delta$ T-DNA) (Koncz *et al.*, 1986) verwendet. Zur Selektion dienten eine durch das Ti-Plasmid (pTiC58 $\Delta$ T-DNA) vermittelte Gentamycin-Resistenz und die chromosomal kodierte Rifampicin-Resistenz.

### 2.9.2 *Saccharomyces cerevisiae* – AH109

Die genomische DNA des *S. cerevisiae* Stamms AH109 wurde zur Amplifikation von *ScSLX1* und *ScSLX4* genutzt (Quelle: Dipl.-Biol. David Schuler). Der Genotyp dieses *S. cerevisiae* Stamms lautet: MATa, trp 1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3- 200, gal4, gal80, LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS- GAL2TATA-ADE2, URA3: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ.

### 2.9.3 *Escherichia coli* – NEB 5-alpha

Zur Vermehrung von Plasmiden wurde der *E. coli* Stamm NEB 5-alpha (Grant *et al.*, 1990) der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) mit folgendem Genotyp verwendet: *fhuA2* $\Delta$ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44*  $\Phi$ 80  $\Delta$ (*lacZ*)*M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

### 2.9.4 *Escherichia coli* – JM110

Die Gene *EcRuvA*, *EcRuvB*, *EcRuvC* und *EcRusA* wurden mittels PCR aus dem Genom des K12-Stamms JM110 amplifiziert. Der Genotyp dieses *E. coli* Stamms lautet: *rpsL (Str<sup>r</sup>) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZ M15]* (Gene auf dem F-Plasmid sind Wildtyp)

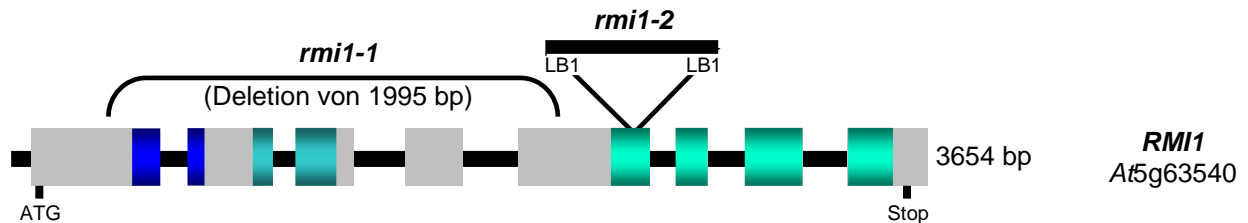
### 2.9.5 *Arabidopsis thaliana* – T-DNA-Insertionsmutanten bzw. Deletionsmutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene T-DNA-Insertionsmutanten des Ökotyps Columbia-0 (Col-0) verwendet. Die eingesetzten T-DNA-Insertionsmutanten wurden von den Konsortien SALK (Alonso *et al.*, 2003), GABI-Kat (Rosso *et al.*, 2003) beziehungsweise SAIL (McElver *et al.*, 2001) bezogen. Zur Untersuchung der somatischen homologen Rekombination (HR) wurde die Reporterlinie IC9C (Molinier *et al.*, 2004) in sämtliche Mutanten eingekreuzt. Einige der Mutanten wurden durch Kreuzungen untereinander kombiniert. In Tabelle 2.4 sind die verwendeten T-DNA-Insertionsmutanten aufgeführt. In Abbildung 2.1 sind die Mutanten

*rmi1-1* und *rmi1-2* schematisch dargestellt. Die Mutante *rmi1-1* zeichnet sich durch eine Deletion von 1995 bp aus, welche sowohl die konservierte DUF1767-Domäne, als auch die OB-fold Domäne 1 umfasst. Die *rmi1-2* Mutante dagegen enthält eine duplizierte T-DNA zu Beginn von Exon 5 und der OB-fold Domäne 2 (Hartung *et al.*, 2008).

**Tabelle 2.4: Verwendete T-DNA-Insertionsmutanten und Deletionsmutanten.** Die Mutanten wurden unter den angegebenen Linien Identifikationsnummern (*Linien ID*) bezogen. In der Spalte *Erstbeschreibung* wird die Arbeit aufgeführt, in der die Mutante erstmals charakterisiert wurde.

Genname	Genlocus	Mutantenname	Linien ID	Erstbeschreibung
RMI1	At5g63540	<i>rmi1-1</i>	SALK_093589	Hartung <i>et al.</i> , 2008
	At5g63540	<i>rmi1-2</i>	SALK_094387	Hartung <i>et al.</i> 2008
MUS81	At4g30870	<i>mus81-1</i>	GABI_113F11	Hartung <i>et al.</i> 2006



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Mutanten *Atrmi1-1* und *Atrmi1-2* anhand der Intron-Exon-Struktur von *AtRMI1*** Für *AtRMI1* (At5g63540) standen in dieser Arbeit die Mutanten *rmi1-1* (SALK\_093589) und *rmi1-2* (SALK\_094387) zur Verfügung. Die Mutante *rmi1-1* zeichnet sich durch eine Deletion von 1995 bp aus, wohin gegen die Mutante *rmi1-2* eine duplizierte T-DNA Insertion in Exon 5 trägt (Hartung *et al.*, 2008). Die konservierten Domänen von *AtRMI1* wurden farblich hervorgehoben: DUF1767 in blau, OB-fold Domäne 1 in petrol und die OB-fold Domäne 2 in türkis.

### 2.9.6 *Arabidopsis thaliana* – Transformationslinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene T-DNA-Konstrukte in unterschiedliche T-DNA-Insertionsmutanten transformiert. Für jede Kombination aus T-DNA-Konstrukt und T-DNA-Insertionsmutante wurden mehrere genetisch verschiedene Linien etabliert, die sich jeweils im Integrationsort des transformierten Konstrukts unterschieden. Die Benennung der Linien erfolgt nach der für die Transformation verwendeten T-DNA-Insertionsmutante beziehungsweise der entsprechenden Reporterlinie und dem für die Transformation eingesetzten Plasmid. Jedes im Rahmen dieser Arbeit erstellte und transformierte Konstrukt trägt einen BAR-ORF mit Promotor und Terminator, dementsprechend lassen sich alle transformierten Pflanzen mittels PPT selektionieren. In Tabelle 2.5 sind alle etablierten und verwendeten Linien aufgelistet.

**Tabelle 2.5: Etablierte und verwendete Transformationslinien.** Die Benennung der Linien erfolgte dabei nach der verwendeten T-DNA-Insertionsmutante bzw. der entsprechenden Reporterlinie und dem eintransformierten Konstrukt. Entstammen die eingebrachten Gene nicht dem Arabidopsis-Genom, ist der Ursprungsorganismus als Kürzel angegeben. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Ec: *Escherichia coli*.

Mutante/Reporterlinie	Plasmid	Transformationslinie
IC9C	pRMI1	IC9C::RMI1
	pRMI1ΔDUF	IC9C::pRMI1ΔDUF
	pRMI1	IC9C::RMI1-OB1
	pRMI1ΔOB2	IC9C::RMI1ΔOB2
	pRMI1ΔDUFΔOB1	IC9C::RMI1ΔDUFΔOB1
<i>rmi1-2</i> IC9C	pRMI1	<i>rmi1-2</i> IC9C::RMI1
	pRMI1ΔDUF	<i>rmi1-2</i> IC9C::pRMI1ΔDUF
	pRMI1ΔOB1	<i>rmi1-2</i> IC9C::RMI1ΔOB1
	pRMI1ΔOB2	<i>rmi1-2</i> IC9C::RMI1ΔOB2
	pRMI1ΔDUFΔOB1	<i>rmi1-2</i> IC9C::RMI1ΔDUFΔOB1
<i>rmi1-1</i> IC9C	pRMI1	<i>rmi1-1</i> IC9C::RMI1
	pRMI1ΔDUF	<i>rmi1-1</i> IC9C::pRMI1ΔDUF
	pRMI1ΔOB1	<i>rmi1-1</i> IC9C::RMI1ΔOB1
	pRMI1ΔOB2	<i>rmi1-1</i> IC9C::RMI1ΔOB2
	pRMI1ΔDUFΔOB1	<i>rmi1-1</i> IC9C::RMI1ΔDUFΔOB1
IC9C	p(DMC1-P)-GEN1	IC9C::(DMC1-P)-GEN1
	p(RMI2-P)-GEN1	IC9C::(RMI2-P)-GEN1
	p(DMC1-P)-MUS81/EME1A	IC9C::(DMC1-P)-MUS81/EME1A
	p(RMI2-P)-MUS81/EME1A	IC9C::(RMI2-P)-MUS81/EME1A
	p(DMC1-P)-ScSLX1/SLX4	IC9C::(DMC1-P)-ScSLX1/SLX4
	p(RMI2-P)- ScSLX1/SLX4	IC9C::(RMI2-P)-ScSLX1/SLX4
	p(DMC1-P)-EcRusA	IC9C::(DMC1-P)-EcRusA
	p(RMI2-P)-EcRusA	IC9C::(RMI2-P)-EcRusA
	p(DMC1-P)-EcRuvABC	IC9C::(DMC1-P)-EcRuvABC
p(RMI2-P)-EcRuvABC	IC9C::(RMI2-P)-EcRuvABC	
<i>rmi1-2</i> IC9C	p(DMC1-P)-GEN1	<i>rmi1-2</i> IC9C::(DMC1-P)-GEN1
	p(RMI2-P)-GEN1	<i>rmi1-2</i> IC9C::(RMI2-P)-GEN1
	p(DMC1-P)-MUS81/EME1A	<i>rmi1-2</i> IC9C::(DMC1-P)-MUS81/EME1A
	p(RMI2-P)-MUS81/EME1A	<i>rmi1-2</i> IC9C::(RMI2-P)-MUS81/EME1A
	p(DMC1-P)-ScSLX1/SLX4	<i>rmi1-2</i> IC9C::(DMC1-P)-ScSLX1/SLX4
	p(RMI2-P)- ScSLX1/SLX4	<i>rmi1-2</i> IC9C::(RMI2-P)- ScSLX1/SLX4
	p(DMC1-P)-EcRusA	<i>rmi1-2</i> IC9C::(DMC1-P)-EcRusA
	p(RMI2-P)-EcRusA	<i>rmi1-2</i> IC9C::(RMI2-P)-EcRusA
	p(DMC1-P)-EcRuvABC	<i>rmi1-2</i> IC9C::(DMC1-P)-EcRuvABC
p(RMI2-P)-EcRuvABC	<i>rmi1-2</i> IC9C::(RMI2-P)-EcRuvABC	
<i>rmi1-1</i> IC9C	p(DMC1-P)-GEN1	<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-GEN1
	p(RMI2-P)-GEN1	<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-GEN1

Tabelle 2.5: Fortsetzung

Mutante/Reporterlinie	Plasmid	Transformationslinie
<i>rmi1-1</i> IC9C	p(DMC1-P)-MUS81/EME1A	<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-MUS81/EME1A
	p(RMI2-P)-MUS81/EME1A	<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-MUS81/EME1A
	p(DMC1-P)-ScSLX1/SLX4	<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-ScSLX1/SLX4
	p(RMI2-P)-ScSLX1/SLX4	<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-ScSLX1/SLX4
	p(DMC1-P)-EcRusA	<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-EcRusA
	p(RMI2-P)-EcRusA	<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-EcRusA
	p(DMC1-P)-EcRuvABC	<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-EcRuvABC
	p(RMI2-P)-EcRuvABC	<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-EcRuvABC

## 2.10 Software und Datenbanken

- analySIS<sup>^</sup>B 5.0 (Olympus Bio-Systems GmbH, Planegg)
- NCBI-BLAST - Basic Local Alignment Search Tool  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>; letzter Zugriff 17.09.12)
- DNASTAR 5.03 Programmsammlung: EditSeq, MapDraw, MegAlign, PrimerSelect, SeqMan (Lasergene)
- FinchTV 1.3 (Geospiza)
- In-Fusion<sup>®</sup> Primer Design Tool  
(<http://bioinfo.clontech.com/infusion/>; letzter Zugriff 05.06.12)
- NCBI – National Center for Biotechnology Information  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; letzter Zugriff 13.12.12)
- TAIR – The Arabidopsis Information Resource  
(<http://www.arabidopsis.org/>; letzter Zugriff 10.12.12)
- SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>; letzter Zugriff 14.05.2012)

## 2.11 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.11.1 Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Genomische DNA wurde mittels einer vereinfachten Methode der DNA-Isolation aus Blattmaterial gewonnen. Hierzu wurde von jeder zu genotypisierenden Pflanze (im Vier- bis Achtblattstadium) ein Blatt abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde mit einem Kunststoff-Pistill homogenisiert und mit 500 µl Shorty-Extraktionspuffer versetzt. Zelltrümmer und nicht homogenisiertes Blattmaterial wurden anschließend für 5 min bei 12500 UPM abzentrifugiert (Z 233 M-2 oder Z333 MK-2), 350 µl des Überstands in ein



neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit gleicher Menge vorgelegtem Isopropanol gegeben und durch Invertieren gemischt. Die ausgefallene DNA wurde in einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 min bei 14000 UPM pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA bei Raumtemperatur oder bei 37 °C getrocknet. Je nach Menge des eingesetzten Blattmaterials wurde die DNA in 50 bis 200 µl TE-Puffer für 15 min bei 37 °C und 700 UPM (Eppendorf Thermomixer compact) gelöst. Die isolierte DNA wurde bei Raumtemperatur gelagert und jeweils 3 µl als Matrize für die PCR-Reaktion zur Genotypisierung eingesetzt.

### **2.11.2 Isolation von RNA aus *A. thaliana***

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy® Plant Mini Kit aus 100 mg 14 Tage alter Keimlinge. Diese wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß abgewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert. Der für die Extraktion eingesetzte Lyse-Puffer RLT wurde vor Verwendung mit 10 µl Thioglycerol pro ml Puffer versetzt. Das Pflanzenmaterial wurde mit einem Kunststoff-Pistill in gefrorenem Zustand homogenisiert und vor dem Auftauen mit 450 µl RLT-Puffer versetzt. Die weitere Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. In Ergänzung zum Herstellerprotokoll wurde der optionale DNase I-Verdau immer durchgeführt. 2,5 µl der isolierten Gesamt-RNA wurden zur Kontrolle auf ein 0,9% TAE Gel zur Agarose-Gelelektrophorese geladen und die Konzentration mit dem Qubit® RNA Broad Range Assay fluorometrisch bestimmt.

### **2.11.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte aus einer 6 ml Übernachtskultur (37 °C, 200 UPM, Inkubationsschüttler Certomat® IS) in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum. Aus 4 ml dieser Kultur wurde nach Vorgaben des peqGold Plasmid Miniprep Kit I (C-Linie) die Plasmid-DNA isoliert. Anstatt des angegebenen Elutionspuffers wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die Plasmidisolierung wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (0,9% TAE-Gel) und einem Restriktionsverdau überprüft. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mit dem Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit oder dem Qubit® dsDNA High Sensitivity Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt.

## **2.12 *In vitro* Arbeiten mit Nukleinsäuren**

### **2.12.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe erfolgte auf Gelen aus 0,9-2% (w/v) Agarose in TAE- oder SB-Puffer mit Ethidiumbromid zur Detektion der

Nukleinsäuren. Sowohl die Proben als auch der Marker wurden mit Laufpuffer versetzt (vgl. Abschnitt 2.3.1). Entsprechend der Länge der Elektrophoresekammern wurde eine konstante elektrische Spannung von 5,0 bis 5,5 Volt/cm bei Verwendung von TAE-Gelen und 5,5 bis 6,5 Volt/cm bei SB-Gelen an die Gelelektrophoresekammer angelegt. Die anschließende Detektion und Dokumentation der Nukleinsäurebanden erfolgte unter Anregung mit UV-Strahlung (312 nm) mit Hilfe des Gel iX Imager und des P91 Photoprinter.

### 2.12.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde als molekularbiologische Standardmethode sehr häufig und mit unterschiedlichen Zielsetzungen angewandt. Abhängig von der jeweiligen Fragestellung wurde die zu verwendende Polymerase gewählt. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen wurden laut Herstellervorgaben zur eingesetzten Polymerase angewandt. Der Reaktionsansatz der PCR wurde ebenfalls entsprechend der Zielsetzung gewählt. Für analytische PCRs wurde ein Gesamtreaktionsansatz von 25 µl, zur Amplifikation von Klonierungsfragmenten ein Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der jeweils eingesetzten Primer (> 14 bp) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m[^\circ] = 64,9 + 41 * (yG + zC - 16,4) / (wA + xT + yG + zC)$$

Hierbei beziehen sich die Variablen w, x, y, z auf die Anzahl der jeweiligen Base. Die verwendeten Annealingtemperaturen für die verwendeten Primerkombinationen sind der Tabelle 6.1 im Anhang zu entnehmen.

### 2.12.3 PCR-basierte Verlängerung von DNA-Fragmenten

Für das Einfügen von DNA-Fragmenten in einen Vektor war es notwendig, Restriktionsschnittstellen bzw. Überhänge mit definierten Homologien zum Vektor oder einem weiteren DNA-Fragment an bereits amplifizierte PCR-Produkte anzufügen. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, die neben der normalen Bindesequenz einen entsprechenden Überhang im 5' Bereich besitzen. Zur Amplifikation wurde die Phusion<sup>TM</sup>-High-Fidelity-DNA-Polymerase verwendet. Die Annealingtemperatur entsprach in den ersten 5 Zyklen der Annealingtemperatur der Primer ohne Überhang. In den Zyklen 6 bis 25 wurde die Annealingtemperatur entsprechend der Gesamtsequenz der Primer erhöht. Überschritt die errechnete Schmelztemperatur 72 °C, wurde die Annealingtemperatur auf 72 °C gesetzt.

#### 2.12.4 Overlap-Extension PCR

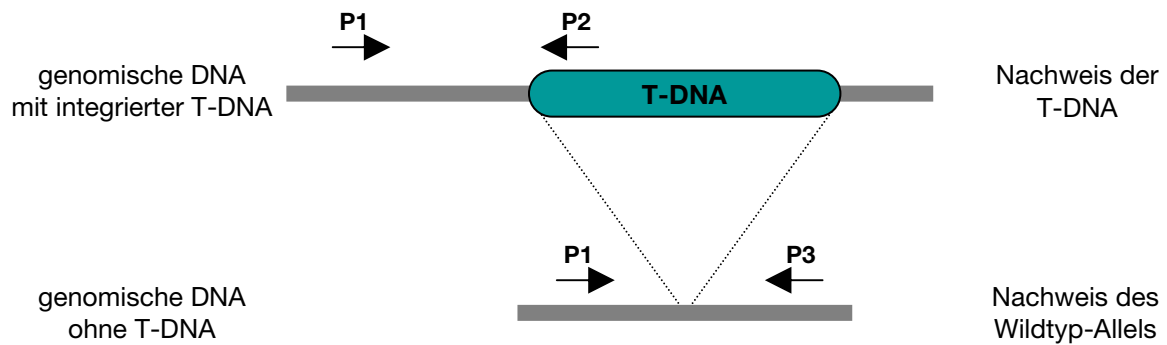
Die Overlap-Extension PCR ist eine Methode zur Verknüpfung von 2 PCR-Produkten mit überlappenden Sequenzen zu einem längeren Produkt. Die Reamplifikation erfolgte hierbei mit Primern die an den äußeren Enden des längeren PCR-Produkts binden. Die beiden DNA-Fragmente, mit einem homologen Sequenzbereich an den zu verknüpfenden Enden, wurden in gleichem molarem Verhältnis als Matrize eingesetzt. Die Annealingtemperatur wurde für die ersten 5 Zyklen entsprechend des homologen Bereiches gewählt, die ebenfalls der Temperatur des bindenden Bereiches der zusätzlich benötigten Überhangprimer entsprach. Die folgenden 20 Zyklen wurde die Annealingtemperatur auf 72 °C erhöht (Sambrook und Green, 2012).

#### 2.12.5 Colony-PCR

Um im Anschluss an eine Transformation von *E. coli* die Integration des DNA-Fragments nachzuweisen, wurde eine Colony-PCR durchgeführt. Hierfür dienten die auf entsprechendem Selektionsmedium gewachsenen *E. coli* Kolonien direkt als Matrize für die PCR. Für den Nachweis wurden für die Amplifikation ein fragmentspezifischer und ein vektorspezifischer Primer eingesetzt. Bei kleineren einzufügenden DNA-Fragmenten wurde aus dem Plasmid über das gesamte DNA-Fragment amplifiziert. Als Polymerase wurde entweder die Taq DNA-Polymerase oder die DreamTaq™ DNA Polymerase verwendet.

#### 2.12.6 PCR-basierte Genotypisierung von T-DNA Insertionslinien bzw. Deletionsmutanten

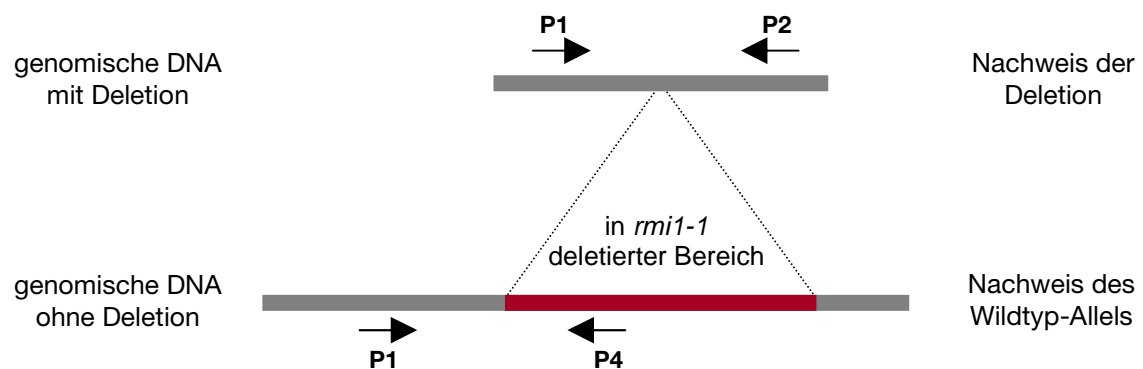
Die PCR-basierte Genotypisierung diente zur Analyse einzelner Pflanzen bezüglich ihrer Mutation (T-DNA-Insertion bzw. Deletion). Durch zwei unabhängige PCR-Reaktionen konnte festgestellt werden, ob es sich um homozygote beziehungsweise hemizygoten Mutanten oder um Wildtyp-Pflanzen handelt. Zur Genotypisierung einer T-DNA Insertionsmutante wurde in einer PCR-Reaktion mit Hilfe eines T-DNA-spezifischen Primers und eines Locus-spezifischen Primers der Übergangsbereich zwischen T-DNA und genomischer Sequenz nachgewiesen. Mit dieser PCR-Reaktion allein kann allerdings nicht zwischen hemizygoten und homozygoten T-DNA-Insertionslinien unterschieden werden. Deshalb wurde in einer zweiten PCR mit zwei genspezifischen Primern der Bereich amplifiziert, in dem die T-DNA integriert sein sollte. Die Elongationszeit dieser Reaktion wurde so weit reduziert, dass ein Produkt nur zustande kommen kann, wenn keine T-DNA inseriert ist, und somit das Wildtyp-Allel vorliegen muss (vgl. Abbildung 2.2). Auch in dieser PCR-Reaktion konnte nicht zwischen hemizygoten Mutanten und Wildtyp-Pflanzen unterschieden werden. Erst durch die Kombination beider PCR-Ergebnisse konnte der Genotyp bestimmt werden.



**Abb. 2.2: Prinzip der Genotypisierung für T-DNA-Insertionslinien.** Der Nachweis der integrierten T-DNA erfolgt durch Amplifikation des Übergangs zwischen genomischer DNA und T-DNA mit Hilfe eines Locus-spezifischen Primers (P1) und eines T-DNA-spezifischen Primers (P2). Unter Verwendung von zwei Loci-spezifischen Primern (P1 und P3) wurde ein Bereich amplifiziert, der den T-DNA-Integrationsort überspannte. Durch die Wahl der Elongationszeit konnte nur ein Produkt entstehen, wenn die T-DNA nicht vorhanden war.

Bei der Genotypisierung der *rmi1-1* Deletionsmutante erfolgte die Bestätigung des deletierten Bereichs mit einem Primerpaar, welches die Deletion überspannte. Die Elongationszeit wurde so gewählt, dass ein Amplifikat nur zustande kommen konnte, wenn die Deletion vorhanden war. Für den Nachweis des Wildtyp-Allels wurde ein Bereich amplifiziert der bis in die Deletion hinein reicht (vgl. Abb. 2.3).

Für die Genotypisierung der *rmi1*-Komplementationslinien, die zusätzlich zur Mutation im Bereich des *RMI1*-Gens ein *RMI1*-cDNA-Konstrukt enthielten, wurden Primer gewählt die im Bereich eines Introns binden.



**Abb.2.3: Prinzip der Genotypisierung der *Atrmi1-1* Deletionsmutante.** Der Nachweis der Deletion der *rmi1-1* Mutante erfolgte durch Amplifikation mit Hilfe eines genspezifischen Primerpaars, dass die Deletion überspannte (P1 und P2). Das Vorhandensein des Wildtyp-Allels konnte mit dem Primerpaar P1 und P4 nachgewiesen werden, in dem ein Bereich amplifiziert wurde, der bis in die Deletion hinein reichte.

### 2.12.7 cDNA-Synthese

Die mit dem RNeasy® Plant Mini Kit extrahierte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RevertAid™ FirstStrand cDNA Synthesis Kits in cDNA umgeschrieben. Um für jede Reaktion 5 mg der Gesamt-RNA einzusetzen, wurde deren Konzentration mit dem Qubit® RNA Broad Range Assay Kit ermittelt und das entsprechende Volumen an RNA mit 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer vermischt. Das Gesamtvolumen wurde mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt. Um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, wurde der Reaktionsansatz 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Nun erfolgte die Zugabe der restlichen Reaktionsbestandteile von 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl RevertAid™ M-MuIV reverse Transkriptase. Die cDNA wurde nach Herstellerangaben synthetisiert und anschließend mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Um eine mögliche genomische Verunreinigung der cDNA festzustellen, wurde ein intronumspannender Bereich von *Aktin2* (*At3g18780*) amplifiziert und die spezifische Bandengröße mit Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

### 2.12.8 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR diente der Analyse des Expressionsniveaus der verschiedenen Konstrukte, welche in die *rmi1-2* beziehungsweise *rmi1-1* Mutante eingebracht wurden. Das Vorhandensein des Konstrukts wurde zwar bereits über den Selektionsmarker PPT nachgewiesen, zusätzlich wurde aber die Expression, mit genspezifischen Primern für die *RM11*-cDNA-Konstrukte geprüft. Die Expressionsanalysen wurden mit dem LightCycler® 480 und der Software des Herstellers durchgeführt. Die eingesetzte Primerkombination wurde so gewählt, dass sowohl die cDNA beider Mutanten, als auch das eingebrachte *RM11*-Komplementationskonstrukt bzw. die *RM11*-Deletionskonstrukte amplifiziert werden konnten. Die Produktgröße für den internen Standard *Aktin2* (*At3g18780*) und *RM11* wurden mit circa 100 bis 300 bp gewählt. Für einen Reaktionsansatz von 20 µl wurden 10 µl LightCycler® SYBR Green I Master (2x), je 0,15 µl der beiden Primer (50 µM), 4,7 µl ddH<sub>2</sub>O und 5 µl cDNA (siehe Abschnitt 2.12.6) verwendet. Für die Bestimmung des Expressionslevels wurden für jede Probe die Primerkombinationen für Aktin2 und RM11 in Triplikaten angesetzt und die gesamte Expressionsanalyse in 3 unabhängigen Experimenten wiederholt. Die Real-Time PCR wurde aufgrund der eingesetzten Hotstart-Polymerase des LightCycler® SYBR Green I Master mit einer initialen Aktivierung der Polymerase und Denaturierung der DNA von 5 min bei 95 °C gestartet. Nach 45 Amplifikationszyklen (10 sec, 95 °C; 20 sec, 57 °C; 40 sec, 72 °C) wurde eine Schmelzkurve erstellt. Die Werte des internen Standards *Aktin2* wurden zur Normalisierung verwendet.

### **2.12.9 Restriktionsverdau**

Für Klonierungen und zur Kontrolle von Plasmiden wurden DNA-Fragmente bzw. Vektoren mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Jeder Restriktionsverdau wurde nach Herstellerangaben angesetzt und je nach Enzymaktivität für 15 bis 60 min beim entsprechenden Temperaturoptimum inkubiert. Mit Ausnahme von *Pi-PspI* mit 65 °C hatten alle Enzyme ein Temperaturoptimum von 37 °C. Für Doppelverdauansätze wurden die Reaktionspuffer so gewählt, dass beide Enzyme eine möglichst hohe Aktivität erreichen konnten. Zur Kontrolle des Restriktionsverdaus wurde ein Teil des Reaktionsansatzes mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese (0,9% TAE-Gel) aufgetrennt und die Größen der DNA-Fragmente überprüft.

### **2.12.10 Dephosphorylierung**

Um die Religation eines linearisierten Plasmids zu vermeiden, wurden freie Phosphate an den Enden des geschnittenen Vektors durch die Antarctic Phosphatase abgespalten. So war eine Ligation ausschließlich mit dem nicht dephosphorylierten Insert möglich. Die Zusammensetzung der Dephosphorylierungsreaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 1 h wurde das Enzym durch Aufreinigung (vgl. Abschnitt 2.12.11) inaktiviert. Es wurden nur Plasmide dephosphoryliert, bei denen das DNA-Fragment über eine einzelne Schnittstelle in den Vektor ligiert werden sollte. Für die auf Homologien basierende In-Fusion® Klonierung wurden linearisierte Plasmide nicht dephosphoryliert.

### **2.12.11 Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Die Aufreinigung von Klonierungsfragmenten erfolgte nach Amplifikation, Restriktionsverdau oder Dephosphorylierung mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kit oder des innuPREP PCRpure Kit. Sie diente der direkten Abtrennung von kleineren unspezifischen DNA-Fragmenten, Oligonukleotiden, Enzymen oder Pufferbestandteilen. Vor der Elution in 30 µl bis 50 µl ddH<sub>2</sub>O wurde die Säule für 1 min bei 10000 UPM (MiniSpin®) trocken zentrifugiert. Die Aufreinigung wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese mit einem 0,9% TAE-Gel überprüft.

### **2.12.12 Aufreinigung von Nukleinsäuren vom Agarosegel**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit. Um das gewünschte Amplikon oder den geschnittenen Vektor von ungewollten DNA-Fragmenten zu trennen wurde der Reaktionsansatz durch Agarose-

Gelelektrophorese mit einem 0,9% TAE-Gel aufgetrennt. Nach ausreichender Auftrennung konnte das gewünschte DNA-Fragment, unter Anregung mit UV-Strahlung, aus dem Gel ausgeschnitten werden. Mit Ausnahme des zusätzlichen trocken-zentrifugieren (1 min, 10000 UPM, MiniSpin®) vor der Elution, wurde die Aufreinigung entsprechend des Hersteller-Protokolls durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30 bis 50 µl ddH<sub>2</sub>O anstatt des mitgelieferten Elutionspuffers.

### **2.12.13 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Integration eines DNA-Fragments in einen linearisierten Vektor erfolgte mit der T4-DNA-Ligase. Zur Ligation wurden Insert und Plasmid in einem molaren Verhältnis 2:1 (Insert:Plasmid) eingesetzt, mit 2 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer, 2 µl T4-DNA-Ligase gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur und mind. 1 h bei 4 °C, bevor der Ligationsansatz direkt für die Transformation von *E. coli* verwendet wurde.

### **2.12.14 Homologie-basierte Klonierung**

Das In-Fusion® HD Cloning Kit oder In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit wurde verwendet, um ein oder mehrere DNA-Fragmente gleichzeitig und mit gerichteter Orientierung in ein Plasmid einzubringen. Die Enden der zu verknüpfenden Fragmente müssen hierzu einen homologen Bereich von mindestens 15 bp aufweisen. Das Enzym der In-Fusion® Reaktion ist eine DNA-Polymerase aus der Virenfamilie der *Poxviridae* mit einer 3'-5' Exonuklease-Aktivität (Hamilton *et al.*, 2007). Sie erzeugt Einzelstrangbereiche an den Enden der DNA-Fragmente und des Plasmids, wodurch das Zusammenlagern der homologen Bereiche der einzelnen Fragmente ermöglicht wird. Die erforderlichen Homologiebereiche zwischen den einzelnen DNA-Fragmenten oder zum nicht dephosphorylierten Plasmid wurden durch Primer mit Adaptersequenz angefügt. Zur Konzipierung der Primer wurde das In-Fusion® Primer Design Tool des Herstellers verwendet. Die Zusammensetzung und Durchführung der In-Fusion® Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Transformation chemokompetenter *E. coli* Bakterien (NEB 5-alpha) wurden jeweils 5 µl der Reaktion und 100 µl Zellen eingesetzt.

### **2.12.15 Sequenzierung**

Zur Überprüfung der Sequenz von Plasmidkonstrukten oder PCR-Produkten wurden die Proben von der Firma GATC Biotech (Konstanz) sequenziert. Nach Abschluss der

Sequenzierung wurden die Sequenzdaten von der Firmenwebseite heruntergeladen und mit den Programmen SeqMan (DNAS<sup>t</sup>ar) sowie FinchTV ausgewertet.

## 2.13 Transformation von DNA in Organismen

### 2.13.1 Transformation von *E. coli*

Die klonierten Konstrukte wurden im Anschluss an die Ligation oder an die In-Fusion<sup>®</sup> Reaktion (vgl. Abschnitte 2.12.11, 2.12.12) zur Vermehrung in chemokompeteten *E. coli*-Zellen (NEB 5-alpha) eingebracht. Die *E. coli*-Zellen wurden mit Hilfe der Rubidiumchlorid-Methode (Sambrook und Russell, 2001) kompetent gemacht. Für die Transformation wurden 5 µl bis 10 µl Ligationsansatz beziehungsweise 5 µl In-Fusion<sup>®</sup> Reaktion mit 100 µl *E. coli*-Zellen gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach 90 s Hitzeschock bei 42 °C wurde die Reaktion erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 1 h bei 37 °C geschüttelt (650 UPM; Eppendorf Thermomixer compact).

### 2.13.2 Transformation von *A. tumefaciens*

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *A. tumefaciens* (Stamm GV3101::pMP90) wurden elektrokompetente Bakterien verwendet. Zur Herstellung dieser Bakterien dienten 200 ml einer in YEB-Medium gewachsenen Agrobakterien-Kultur ( $OD_{560} = 1$ ). Die Zellen wurden mit 4500 UPM bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert (Z 383 K, Ausschwingrotor) und dreimal mit sterilem und kaltem 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Zur längeren Lagerung der Zellen bei -80 °C wurden die Zellen in 8 ml 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Transformation wurden 100 µl elektrokompetente Agrobakterien-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 5 µl Plasmid (100 bis 200 ng Plasmid) gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem GenePulser<sup>®</sup> II und den Geräteeinstellungen 2,5 kV/200 Ω/5 ms. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl YEB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 28 °C und 600 UPM geschüttelt (Eppendorf Thermomixer compact). Jeweils 100 µl eines Transformationsansatzes wurden zur Selektion auf YEB-Platten mit den erforderlichen Antibiotika (Rifampicin, Gentamycin, Spectinomycin) ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Zur weiteren Kultur wurden 5 ml flüssiges YEB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika mit einer Kolonie beimpft und für etwa 12 – 16 h bei 28 °C und 200 UPM (Inkubationsschüttler Certomat<sup>®</sup> IS) geschüttelt. Diese Übernachtskultur diente zur Herstellung eines Glycerinstocks, welcher über einen längeren Zeitraum bzw. bis zur Transformation von *A. thaliana* bei -80 °C gelagert werden konnte.



### 2.13.3 Transformation von *A. thaliana*

Die stabile Transformation von *A. thaliana* erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Variante der „Floral Dip“-Methode von Clough und Bent (1998). Hierzu wurden etwa 5 bis 6 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen vor der Transformation für ca. 1 h gewässert und von Schoten bzw. geöffneten Blüten befreit. Das binäre Plasmid wurde zuvor in Agrobakterien transformiert (vgl. Abschnitt 2.13.2) und hiermit eine 25 ml Vorkultur beimpft (12 – 16 h; 28 °C; 200 UPM, Inkubationsschüttler Certomat® IS). Diese diente zum Animpfen der Hauptkultur (400 ml YEB; 12 – 16 h; 28 °C; 200 UPM). Beide Kulturen enthielten die entsprechenden Antibiotika zur Selektion der transformierten Agrobakterien (Rifampicin, Gentamycin, Spectinomycin). Die Agrobakterienkultur ( $OD_{600}$  1,8) wurde durch Zentrifugation (6000 g, 10 min, 20 °C, Z 383 K, Ausschwingrotor) abzentrifugiert und anschließend in 800 ml Infiltrationsmedium (vgl. Abschnitt 2.3.6) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Silwet® L-77 und 800 µl des Induktors Acetosyringon wurden die überirdischen Pflanzenteile der *Arabidopsis*-Pflanzen für 20 s in die Bakteriensuspension getaucht. Nach dem „Floral Dip“ wurden die Pflanzen horizontal in eine befeuchtete dunkle Kiste gelegt und nach ca. 24 h mit Leitungswasser abgesprüht. Die Pflanzen wurden bis zur Samengewinnung im Gewächshaus angezogen.

## 2.14 Pflanzenspezifische Methoden

### 2.14.1 Lagerung von Saatgut

*Arabidopsis*-Saatgut wurde trocken, dunkel und bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.14.2 Pflanzenanzucht im Gewächshaus

Pflanzen, die zur Transformation, Kreuzung oder Samengewinnung dienten, wurden im Gewächshaus angezogen. Das Saatgut wurde über Nacht in Leitungswasser bei 4 °C zur Stratifikation gelagert und anschließend im S1-Gewächshaus auf einem 1:1 Gemisch aus Floraton 3 und Vermiculite (Körnung 2 – 3 mm) ausgebracht. Der Tag/Nacht-Rhythmus betrug 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei 22 °C.

### 2.14.3 Oberflächensterilisation von *A. thaliana* Saatgut - sterile Pflanzenanzucht

Zur Anzucht von *A. thaliana* unter axenischen Bedingungen im Anzuchtsschrank CU-36L4 bzw. im Anzuchtsraum wurde das Saatgut zunächst oberflächensterilisiert. Die benötigte Menge Saatgut wurde in ein 1,5 ml oder 2 ml Reaktionsgefäß abgefüllt und für 1 min in 300 µl 70% (v/v) Ethanol inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4000 UPM (Minispin) für 30 s

wurde das Ethanol abgenommen und die Samen mit 800 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend erfolgte ein acht-minütiger Inkubationsschritt in 500 µl 4% (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung (frisch hergestellt; 12% (v/v) Stammlösung) unter gelegentlichem Invertieren oder in der neoLab-Zentrifuge mit Schüttel-Funktion. Die Abnahme der NaOCl-Lösung nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 sec, 4000 UPM) und die folgenden zwei Waschschriffe mit jeweils 800 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O erfolgten an der Sterilbank. Zur Stratifikation wurden die Samen über Nacht bei 4 °C in 1 ml steriler 0,1% (w/v) Agarose-Lösung inkubiert. Das Saatgut wurde je nach Bedarf als Sammelaussaat oder Einzelaussaat auf GM-Festmedium (vgl. Abschnitt 2.3.4) ausgebracht. Entsprechend der Fragestellung wurde dem Medium PPT zur Selektion transformierter Pflanzen und evtl. Cefotaxim zur Unterdrückung der zur Transformation verwendeten Agrobakterien beigegeben. Die sterile Anzucht erfolgte für etwa 2 Wochen im Anzuchtsschrank (Percival CU-36L4) mit 16 h Belichtungsphase bei 22 °C und 8 h Dunkelphase bei 20 °C oder im klimatisierten Anzuchtsraum (Tag-/Nacht-Rhythmus 16 h / 8 h, 22-24 °C). Nach ca. 2 bis 3 Wochen konnten die Pflanzen zur Vermehrung in Erde pikiert und im S1-Gewächshaus zur Samenreife gebracht werden.

#### **2.14.4 Kreuzungen von *A. thaliana***

Um die genetischen Merkmale einzelner T-DNA-Insertionsmutanten zu kombinieren bzw. um das Konstrukt einer etablierten Reporterlinie einzubringen, mussten verschiedene Kreuzungen durchgeführt werden. An der zur Kreuzung vorgesehenen Mutterpflanze wurden zunächst alle Schoten, offenen Blüten und nicht benötigte Blütenstände entfernt. Je Blütenstand wurde von 2-3 geschlossenen Knospen das Fruchtblatt freipäpariert, indem Kelch-, Kron- und Staubblätter entfernt wurden. Zur Befruchtung wurden mehrere vollentwickelte Blüten der Vaterpflanze über die Narbe des weiblichen Stempels gestrichen, bis diese sichtbar mit Pollen behaftet war. Bis zur Bildung und Reifung der Schoten wurden neu gebildete Triebe und Blüten der gekreuzten Pflanzen regelmäßig zurückgeschnitten. Das geerntete Saatgut wurde nach einer Trocknungszeit von 2 bis 4 Tagen sterilisiert (vgl. Abschnitt 2.14.3) und auf GM-Platten ausgebracht. Die Pflanzen der F1-Generation wurden mittels PCR-basierter Genotypisierung (vgl. Abschnitt 2.12.6) auf das Vorhandensein der gewünschten T-DNA-Insertionen überprüft. Die nachfolgende F2-Generation wurde ebenfalls einer Genotypisierung unterzogen und Pflanzen der benötigten Genkombinationen vermehrt.

#### **2.14.5 Linienetablierung nach der Transformation von *A. thaliana***

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene T-DNA-Konstrukte mittels *A. tumefaciens* in *A. thaliana* eingebracht. Aus diesen Transformationen wurden jeweils genetisch verschiedene Linien etabliert, welche die T-DNA homozygot an nur einem Locus im Genom enthalten (homozygote *single-locus* Linien). Zur Selektion der transgenen Pflanzen wurde über die

verschiedenen Generationen die PPT-Resistenz genutzt. Etwa 130 mg Saatgut der T1-Generation wurden nach der Oberflächensterilisation in 50 ml 0,1% (w/v) steriler AgaroseLösung aufgenommen und auf GM Platten mit PPT und Cefotaxim verteilt. Die anhand der PPT-Resistenz identifizierten Primärtransformanten (T1-Generation) wurden durch Selbstung vermehrt und die segregierende T2-Generation auf Selektionsmedium auf eine 3:1 (beziehungsweise 1:2:1) Aufspaltung untersucht. Nach Mendel sollte die Folgegeneration einer T1-Pflanze, welche die T-DNA hemizygot an nur einem Locus enthält, 1:2:1 aufspalten (homozygot : hemizygot : Wildtyp). Das bedeutet, 75% der Pflanzen sollten auf Selektionsmedium wachsen, die restlichen 25% aufgrund der fehlenden T-DNA absterben. Ein anderes Aufspaltungsmuster würde auf eine Integration der T-DNA an mehreren Loci hinweisen. Zur *single locus*-Analyse wurden insgesamt 50 Pflanzen untersucht und statistisch mit dem  $\chi^2$ -Test mit dem kritischen Wert  $\chi^2_{(1, 0.95)}$  ausgewertet. Jeweils 10 Pflanzen einer identifizierten *single-locus*-Linie wurden erneut durch Selbstung vermehrt und in der T3-Generation auf homozygotes Vorliegen der T-DNA überprüft. Aus der T3-Generation wurden nun jeweils 20 Pflanzen vermehrt und gemeinsam geerntet. Erst die T4-Generation wurde zur Untersuchung hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Genotoxinen (vgl. Abschnitt 2.14.6) und der homologen Rekombination (vgl. Abschnitt 2.14.7) untersucht beziehungsweise zur cytologischen Untersuchung meiotischer Zellen (vgl. Abschnitt 2.14.8) verwendet.

#### 2.14.6 Sensitivitätstests

Zur Charakterisierung der Sensitivität verschiedener transgener Linien im Vergleich zur Mutante *rmi1-2* und dem entsprechenden Wildtyp, wurde deren Wachstum in Anwesenheit der Genotoxine MMS und Cisplatin untersucht. Hierfür wurde das oberflächensterilisierte Saatgut nach der Stratifikation auf GM-Platten ausgebracht und für sieben Tage im Anzuchtsschrank Percival CU-36L4 inkubiert. Nun erfolgte das Umsetzen von sechsmal 10 Pflanzen in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte, in die zuvor 4 bzw. 5 ml flüssiges GM vorgelegt wurden (4 ml für Ansätze mit Genotoxinbehandlung bzw. 5 ml für Kontrollansätze). Die Zugabe von jeweils 1 ml Genotoxin-Lösung fand am Folgetag statt. Hierzu wurden die Genotoxinkonzentrationen entsprechend der gewünschten Endkonzentration mit GM Flüssigmedium eingestellt. Die verwendeten Genotoxinkonzentrationen sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Genau 14 Tage nach der Mutagenzugabe erfolgte die Bestimmung des Frischgewichts der Pflanzen mit der Analysenwaage AB104-S. Überschüssige Flüssigkeit wurde hierfür mit Küchentüchern durch leichtes Andrücken entfernt. Die Auswertung erfolgte prozentual in Bezug auf die unbehandelten Referenzansätze. Aus mindestens 3 unabhängigen Analysen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet und in einem Säulendiagramm dargestellt.

**Tabelle 2.6: Verwendete Genotoxinkonzentrationen für Sensitivitätstests.** Die angegebenen Konzentrationen sind jeweils auf 5 ml Gesamtvolumen eines Wells bezogen und wurden für jeden Sensitivitätstest aus den gegebenen Stammlösungen (Cisplatin 1 mM, MMS 100%) hergestellt.

Genotoxin	Konzentrationen
<i>cis</i> -Diamin-dichlorid-platin (II) (Cisplatin)	5 $\mu$ M / 10 $\mu$ M
Methylmethansulfonat (MMS)	40 ppm / 60 ppm / 80 ppm / 100 ppm

### 2.14.7 Bestimmung der Rekombinationsrate

Die Rate der somatischen homologen Rekombination wurde für die etablierten transgenen Linien, für die *rmi1-2* Mutante und für den entsprechenden Wildtyp mit Hilfe von Rekombinationstests bestimmt. Der Nachweis der HR verläuft über zwei nichtfunktionelle Fragmente des  *$\beta$ -Glucuronidase*-Gens mit einem überlappenden homologen Bereich der Reporterlinie IC9C (Molinier *et al.*, 2004). Die beiden Fragmente liegen in direkter Orientierung mit ca. 700 bp Abstand zueinander. Das C-terminale Fragment folgt dabei auf das N-terminale Fragment, so dass eine Restaurierung des *GUS*-Gens nur durch intermolekulare homologe Rekombination möglich ist. Durch intrachromosomale HR würde ein zirkuläres DNA-Molekül entstehen, welches aus der chromosomalen DNA entfernt werden würde. Zur Bestimmung der somatischen HR-Rate wurde das Saatgut sterilisiert (vgl. Abschnitt 2.14.3), über Nacht bei 4 °C stratifiziert und am Folgetag auf GM Festmedium ausgesät. Nach sieben Tagen im Anzuchtsschrank wurden pro Linie 40 Keimlinge in eine Hälfte einer zweigeteilten Petrischale (92 mm x 16 mm) in flüssiges GM-Medium überführt. Verwendet wurden 9 ml GM für Ansätze mit Genotoxin (Cisplatin) und 10 ml GM für Ansätze ohne Genotoxin. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Zugabe von 1 ml Cisplatinlösung in jeden Ansatz mit Genotoxininduktion. Die Cisplatinkonzentration wurde zuvor mit flüssigem GM eingestellt, um eine Endkonzentration von 3  $\mu$ M zu erreichen. Bis zur histochemischen Färbung wurden die Pflanzen eine Woche im Anzuchtsschrank inkubiert. Der Nachweis des funktionellen  *$\beta$ -Glucuronidase*-Gens erfolgt durch die Umsetzung des künstlichen Substrats X-GlcA (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-  $\beta$ -D-Glucuronid) zu einem blauen unlöslichen Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo). Hierfür wurden die Pflanzen für 2 Tage bei 37 °C in 10 bis 12 ml Färbelösung (vgl. Abschnitt 2.3.3) inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung durch 20 – 25 ml 70% (v/v) Ethanol (vergällt) ersetzt und die Ansätze über Nacht bei 60 °C inkubiert, um die Blattfarbstoffe aus den Blättern herauszulösen und so das Auszählen der apparenten Rekombinationsereignisse in Form blauer Areale zu ermöglichen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur. Zur Auswertung der Rekombinationstests wurden die blauen Sektoren pro Pflanze (ohne Wurzel) bestimmt und der Mittelwert pro Ansatz berechnet. Zur Bestimmung der Rekombinationsrate wurden die Mittelwerte aus 3 unabhängige Experimente gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

### 2.14.8 Präparation männlicher Meiozyten

Die Chromatinpräparation männlicher Meiozyten diente der cytologischen Untersuchung der Chromosomen während der Meiose. Hierzu wurden die Meiozyten aus den Antheren von *A. thaliana* nach der Vorschrift von Armstrong *et al.* (2009) präpariert. In ca. 5 ml Fixierlösung (vgl. Abschnitt 2.3.5) wurden die primären Blütenstände ca. 4 Wochen alter *A. thaliana* Pflanzen fixiert. Die Fixierlösung wurde erneuert bis die Blütenstände völlig entfärbt waren und keine Grünfärbung der Lösung mehr auftrat. Diese Blütenstände konnten nun mehrere Wochen bei Raumtemperatur bzw. mehrere Monate bei -20 °C in Fixierlösung aufbewahrt werden.

Zur Präparation mit Hilfe eines Binokulars wurden 3 bis 4 Blütenstände in einen schwarzen Farbnapf überführt und mit 1 - 2 ml frischer Fixierlösung feucht gehalten. Bereits geöffnete Blüten und postmeiotische Knospen mit sichtbar gelben Pollen wurden entfernt. Die übrigen kugelförmigen Knospen wurden vom Blütenstand separiert und die Fixierlösung mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Nun wurden die Knospen zweimal für 5 min in 1 bis 2 ml 0,01 M Citratpuffer (vgl. Abschnitt 2.3.5) gewaschen. Hierbei mussten aufschwimmende Blütenknospen mit der Präpariernadel untergetaucht werden. Anschließend wurde der Citratpuffer durch 1 ml Verdau-Lösung (333 µl Verdau-Stammlösung und 667 µl 0,01 M Citratpuffer) ersetzt. Aufschwimmende Knospen wurden ebenfalls untergetaucht und der gesamte Farbnapf für 1,25 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Cellulase/Pectolyase-Verdau wurde durch Austausch der Verdau-Lösung durch kaltes sterilisiertes Leitungswasser gestoppt. Für jedes Präparat wurden 3 Knospen mit einer Pasteurpipette auf einen Objektträger übertragen und überschüssige Flüssigkeit mit einem Küchentuch aufgesogen. Die Knospen wurden mit einer flexiblen Präpariernadel zerquetscht, wobei darauf geachtet wurde, dass das Präparat nicht austrocknet. Die zerdrückten Knospen wurden mit 7 µl 60 % Essigsäure vermischt und anschließend für ca. 30 s auf eine 45 °C warme Heizplatte gelegt. Sobald sich der Tropfen leicht abgerundet hatte, wurde er mit je 1 ml Fixierlösung umkreist und abgespült. Das Präparat wurde von der Rückseite her mit einem Fön vollständig getrocknet. Die Färbung des Chromatins erfolgte mit je 10 µl VECTASHIELD Mounting medium with DAPI. Abschließend wurde ein Deckglas aufgelegt und die Präparate bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop mit einem Filtereinsatz zur Detektion von DAPI bei 4 °C und abgedunkelt aufbewahrt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Funktionelle Untersuchungen zu *AtRMI1 in planta*

Die Mutanten *Atrmi1-1* und *Atrmi1-2* weisen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Rekombinationsrate und ein reduziertes Wachstum nach Behandlung mit den DNA-schädigenden Agenzien Cisplatin und MMS auf (Hartung *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Phänotypen wird RMI1 eine Funktion in der Unterdrückung der somatischen HR und in der Reparatur von DNA-Schäden in Folge von Crosslinks oder Alkylierungen zugewiesen. Da sich diese Phänotypen ebenfalls in den Mutanten *Atrecq4A* und *Attop3α* widerspiegeln, wird eine Funktion von RMI1 in Zusammenarbeit mit seinen Komplexpartnern RECQ4A und TOP3α zur Unterdrückung von somatischen CO-Produkten angenommen (Hartung *et al.*, 2006, 2008). Die Funktion von RMI1 und dem RTR-Komplex in der Suppression somatischer COs ist evolutionär stark konserviert. Zusätzlich zur somatischen Funktion übernimmt *AtRMI1* eine wichtige Rolle in der Auflösung meiotischer Rekombinationsintermediate. Es genügt schon die Mutation von *AtRMI1*, um die Fertilität der Pflanzen einzuschränken beziehungsweise um eine Sterilität der Pflanzen herbeizuführen, wodurch die essentielle Funktion von *AtRMI1* in der Meiose offensichtlich wird (Hartung *et al.*, 2008; Chelysheva *et al.*, 2008). In Bezug auf die somatischen und meiotischen Funktionen von *AtRMI1* sollten nun die in unterschiedlichen Organismen konservierten Proteinbereiche den verschiedenen Funktionen zugeordnet werden.

#### 3.1.1 Experimenteller Aufbau des Komplementationsversuchs

Zu Beginn wurden anhand bereits veröffentlichter Daten zum RMI1-Homolog aus Säugern und *A. thaliana* (Yin *et al.*, 2005; Chelysheva *et al.*, 2008; Raynard *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008) die zu deletierenden Bereiche des *AtRMI1* Homolog anhand der konservierten Sequenzabschnitte ermittelt. Die Sequenzhomologie zwischen *HsRMI1* und *AtRMI1* beträgt auf die gesamte Länge nur 15,5%, die Domänen an sich sind konserviert (vgl. Abbildung 3.1). Ähnlich wie das menschliche Homolog enthält auch *AtRMI1* drei konservierte Bereiche: Die N-terminal gelegene DUF1767 Domäne (pfam08585) konnte den Aminosäuren 101 bis 194 von *AtRMI1* zugeordnet werden (Marchler-Bauer *et al.*, 2007; Chelysheva *et al.*, 2008). C-terminal von der DUF1767 Domäne schließt sich die putative OB-fold Domäne 1 in dem Bereich von AS 115 bis AS 191 an, diese wurde 2005 von Yin *et al.* für das menschliche RMI1-Homolog bestimmt

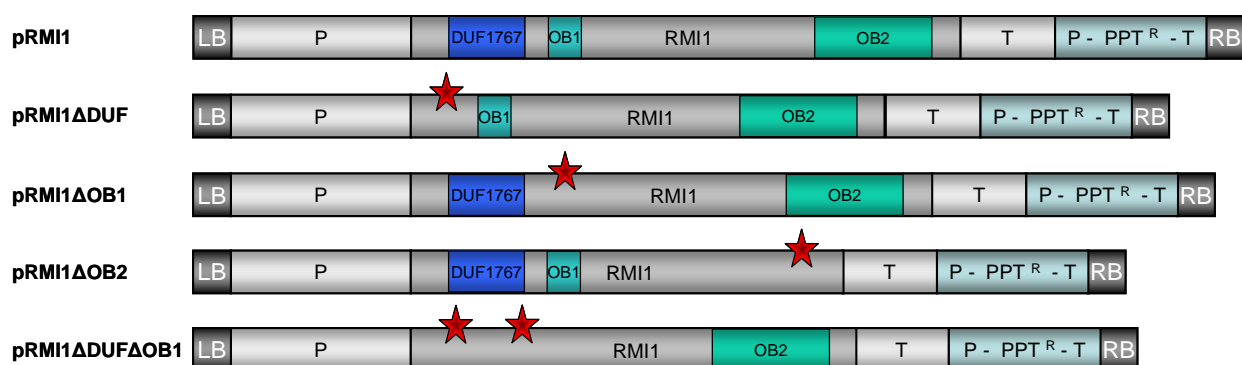
(Yin *et al.*, 2005). Für den Bereich AS 151 bis AS 196 wurde für *HsRMI1* (ehemals *HsBLAP75*) eine essentielle Funktion für die Bindung der Helikase BLM und der Topoisomerase beschrieben. Das konservierte Lysin (K166) in diesem Bereich ist essentiell für die Interaktion mit der Topoisomerase und entspricht K235 in *AtRMI1* (Raynard *et al.*, 2008). In dem Konstrukt *RMI1ΔOB1* dieser Arbeit wurde der Sequenzbereich von AS 234 bis AS 258 deletiert, der das konservierte Lysin enthält. Der konservierte Bereich der OB-fold Domäne 2 umfasst die



**Abb. 3.1: Alignment der RMI1-Homologe aus *A. thaliana*, *H. sapiens*, *M. musculus* und *O. sativa*.** Identische Aminosäuren sind gelb beziehungsweise blau unterlegt, ähnliche grün. Die Sequenzbereiche, die in den verschiedenen RMI1-Varianten dieser Arbeit deletiert wurden, sind rot markiert ( $\Delta$ DUF: AS 101 bis 194;  $\Delta$ OB1: AS 234 bis 258;  $\Delta$ OB2: AS 485 bis 644). Der gelb markierte Bereich im N-Terminus umfasst die konservierte DUF1767 Domäne (pfam08585; Marchler-Bauer *et al.*, 2007; Chelysheva *et al.*, 2008), der darauf folgende blau markierte Sequenzbereich entspricht der putativen OB-fold Domäne die 2005 für *HsRMI1* beschrieben wurde (Yin *et al.*, 2005). Für den grün markierten Aminosäurebereich konnte im Menschen gezeigt werden, dass er essentiell für die Bindung von *HsBLM* und *HsTopoIII $\alpha$*  ist. Innerhalb der OB-fold Domäne 1 wurde das konservierte Lysin (★) als essentielle Aminosäure für die Interaktion mit *HsTopoIII $\alpha$*  beschrieben (Raynard *et al.*, 2008). Im C-Terminus liegt der konservierte Bereich der OB-fold Domäne 2 (schwarz markiert; Chelysheva *et al.*, 2008). Für das menschliche RMI1-Homolog konnte für diesen Bereich (hellblau) eine DNA-Bindeaktivität nachgewiesen werden (Raynard *et al.*, 2008).

Aminosäuren AS 485 bis AS 627 in *A. thaliana* und AS 480 bis AS 625 im Menschen. Für das Konstrukt RMI1 $\Delta$ OB2 wurde der Aminosäurebereich AS 485 bis AS 644 im C-Terminus deletiert.

Zur funktionellen Untersuchung der konservierten Domänen in *AtRMI1* wurden fünf verschiedene *RMI1*-Varianten kloniert. Alle Konstrukte setzen sich aus dem natürlichen Promotorbereich, der codierenden Sequenz von *AtRMI1* und dem natürlichen Terminatorbereich zusammen. Sowohl der Promotorbereich (1049 bp stromaufwärts des Startcodons) als auch der Terminatorbereich (400 bp nach dem Stoppcodon), wurden aus genomischer DNA amplifiziert und enthalten 5'-UTR (*untranslated region*) sowie 3'-UTR. Die codierende Sequenz von *AtRMI1* stammt aus der Amplifikation des cDNA Fragments im Plasmid pGEM-Teasy-RMI1 (Knoll, 2007) und ist durch Start- und Stoppcodon begrenzt. In diesem Bereich unterscheiden sich die in dieser Arbeit klonierten Komplementationskonstrukte durch die Deletion einzelner *RMI1*-Domänen (vgl. Abbildung 3.2). Hierzu wurden die notwendigen Einzelfragmente aus cDNA amplifiziert und in einer zweiten PCR-Reaktion Homologien für die weitere Klonierung mittels Überhangprimern an die Einzelfragmente angefügt (vgl. Tabelle 6.2). Die Einzelfragmente wurden anschließend über das In-Fusion<sup>®</sup> Prinzip in den zuvor linearisierten Vektor pSBO-2 (Bonnet, 2009) eingefügt. Dieser basiert auf dem binären Vektor pZP201 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) und enthält zusätzlich einen *BAR open reading frame* mit 35S-Promotor und 35S-Terminator innerhalb der Bordersequenzen der T-DNA. Die Integration der *RMI1*-Sequenzbereiche mit Promotor und Terminator erfolgte jeweils stromaufwärts der *BAR*-Kassette in die *PacI*-Restriktionsschnittstelle der *MCS* von pSBO-2. In Abbildung 3.2 ist eine Übersicht der klonierten RMI1-Komplementationskonstrukte dargestellt.



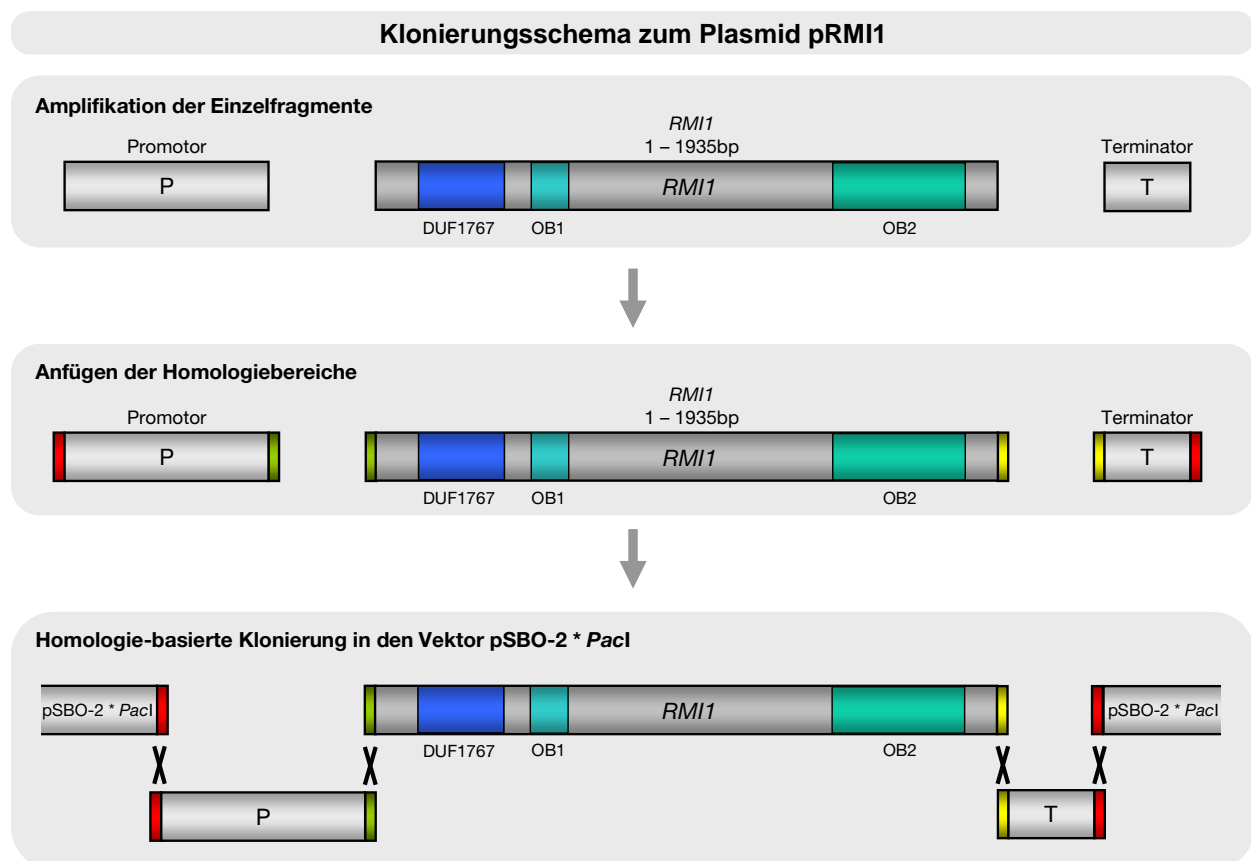
**Abb. 3.2: Übersicht der T-DNA-Bereiche der verschiedenen RMI1-Komplementationsvektoren.** Schematisch dargestellt sind die T-DNA-Bereiche der fünf Plasmide, die durch Agrobakterien-vermittelte Transformation stabil in das Genom der jeweiligen Linien integriert wurden. Die deletierten Bereiche sind durch einen Stern gekennzeichnet. Jedes Konstrukt enthält einen *BAR open reading frame* mit 35S Promotor und Terminator des Blumenkohl-Mosaik-Virus (P – PPT<sup>R</sup> – T) zur Selektion positiver Transformanden über die PPT-Resistenz. Die Konstrukte werden durch die Sequenzen der left border (LB) und right border (RB) begrenzt, die für die Agrobakterien-vermittelte Transformation benötigt werden.



Das Plasmid pRMI1 enthält die gesamte codierende Sequenz von *AtRMI1* unter Kontrolle des natürlichen Promotors und Terminators (vgl. Abbildung 3.2, 3.3). Die Expression dieses Konstrukts führt zu einem Protein, das dem natürlichen *AtRMI1* entspricht.

Während der Klonierungen wurde jedes Fragment nach der Amplifikation und Aufreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die richtige Größe und auf Verunreinigungen kontrolliert. Für die In-Fusion® Reaktion wurde der DNA-Gehalt der einzelnen Proben mit dem Qubit® Fluorometer bestimmt und im Verhältnis 2:1 (Vektor:Insert) eingesetzt. In Abbildung 3.3 ist beispielhaft das Klonierungsschema zum Plasmid pRMI1 gezeigt.

In der codierenden Sequenz der vier Deletionskonstrukte wurde entweder der Bereich der DUF1767 Domäne, der OB-fold Domäne 1, der OB-fold Domäne 2 oder der DUF1767 Domäne und der OB-fold Domäne 1 entfernt (vgl. Abbildung 3.2). Zur Amplifikation der Einzelfragmente für die Konstrukte RMI1 $\Delta$ DUF, RMI1 $\Delta$ OB1 und RMI1 $\Delta$ OB2 wurde das Plasmid pRMI1 als Matrize verwendet. Für das Konstrukt RMI1 $\Delta$ DUF $\Delta$ OB1 wurde der Sequenzbereich des



**Abb. 3.3: Klonierungsschema zum Plasmid pRMI1.** Die Amplifikation des Promotorbereiches (P) und des Terminatorbereiches (T) erfolgte aus genomischer DNA. Für die Amplifikation der codierenden Sequenz von *AtRMI1* wurde das Plasmid pGEM-Teasy-RMI1 (Knoll, 2007) verwendet. Zusätzlich sind im Schema die drei konservierten RMI1-Domänen angegeben: DUF1767 Domäne, OB-fold Domäne 1 (OB1) und die OB-fold Domäne 2 (OB2). Die für die Homologie-basierte In-Fusion® Reaktion benötigten homologen Bereiche (farblich markiert) wurden in einer zweiten PCR-Reaktion angefügt. Zur Herstellung des Vektors pRMI1 wurde der mit *PacI* linearisierte Vektor pSBO-2 mit dem Promotorfragment, dem Fragment der codierenden *RMI1*-Sequenz und dem Terminatorfragment über die Homologien rekombiniert. Die Restriktionsschnittstelle für *PacI* blieb dabei beidseitig erhalten.

Promotors bis zur DUF1767 Domäne und der daran anschließende Bereich bis zur OB-fold Domäne 1 aus dem Plasmid pRMI1 $\Delta$ DUF amplifiziert. Die benötigten homologen Bereiche wurden auch in diesem Fall in einer zweiten PCR-Reaktion mit Überhangprimern (vgl. Tabelle 6.2) angefügt. Das zweite Fragment, das den RMI1-Sequenzbereich nach der OB-fold Domäne 1 (775 bp bis 1935 bp) und den Terminatorbereich umfasst, wurde bereits für die Klonierung von pRMI1 $\Delta$ OB1 amplifiziert und konnte für das Konstrukt RMI1 $\Delta$ DUF $\Delta$ OB1 ebenfalls eingesetzt werden.

Um Schnittstellen zwischen Promotorbereich, codierender Sequenz und Terminatorbereich sowie innerhalb der codierenden Sequenz nach Deletion der einzelnen Domänen zu vermeiden, wurden die einzelnen DNA-Fragmente über Homologie-basierte Klonierungsabläufe mit dem linearisierten Vektor pSBO-2 verknüpft. Die Überhänge im 5' Bereich des Promotors, sowie im 3' Bereich des Terminators wurden so konzipiert, dass die verwendete Restriktionsschnittstelle *PacI* der MCS (*multiple cloning site*) des Vektors pSBO-2 nach der In-Fusion<sup>®</sup> Reaktion beidseitig der eingefügten Fragmente erhalten blieb (Klonierungsschemata zu den Deletionskonstrukten sind im Anhang dargestellt, Abbildung 6.1, 6.2, 6.3, 6.4).

Vor der Transformation der klonierten Plasmide wurden der *RMI1*-Sequenzbereich mit Promotor- und Terminatorsequenz, sowie die Verknüpfungsbereiche mit dem Vektor sequenziert. Bis auf eine Punktmutation in den Konstrukten pRMI1 und pRMI1 $\Delta$ OB2 sind keine Veränderungen in den Sequenzen aufgetreten. Bei dieser Mutation handelt es sich um einen Austausch der Base Thymin an der Stelle 779 der *RMI1* cDNA-Sequenz zu einem Cytosin. Da sowohl das Triplet TTA als auch CTA für die Aminosäure Leucin codiert, handelt es sich bei dieser Punktmutation um eine stille Mutation. Daher hat die Sequenzveränderung keine Einfluss auf die Proteinstruktur und alle Konstrukte wurden für die weiteren Analysen verwendet.

Die Vektoren pRMI1, pRMI1 $\Delta$ DUF, pRMI1 $\Delta$ OB1, pRMI1 $\Delta$ OB2 und pRMI1 $\Delta$ DUF $\Delta$ OB1 wurden über Agrobakterien-vermittelte Transformation in die Mutanten *Atrmi1-1* IC9C beziehungsweise *Atrmi1-2* IC9C transformiert (vgl. Abschnitt 2.13.3).

Um negative Auswirkungen aufgrund der Expression des Konstrukts auszuschließen, wurde zusätzlich jedes Konstrukt zur Kontrolle auch in den dazugehörigen Wildtyp (IC9C) transformiert. Aus jedem Transformationsansatz wurden mehrere transgene *homozygote single-locus* Linien etabliert, die aufgrund unterschiedlicher T-DNA-Integrationsorte genetisch verschieden waren. Sowohl die *single-locus* Analysen (T2-Generation), als auch die Identifizierung der Linien, die das eingebrachte Konstrukt homozygot trugen (T3-Generation), wurden anhand der eingebrachten PPT-Resistenz durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.14.5).

Die sterile *Atrmi1-1* Mutante musste zusätzlich vor jeder Vermehrung auf die hemizygot vorliegende Deletion überprüft werden, da Pflanzen mit homozygot vorliegender Deletion steril sind (vgl. Abschnitt 2.12.6, Abbildung 2.3).

Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Linien der T4-Generation nochmals auf alle relevanten genotypischen Eigenschaften überprüft. Dazu gehörte die PCR-basierte Genotypisierung in Bezug auf die T-DNA Insertion im Genlocus *AtRMI1* der *Atrmi1-2* IC9C Linie und die Deletion von 2 kb der Mutante *Atrmi1-1* IC9C. Das Reporterkonstrukt IC9C konnte anhand der Hygromycinresistenz und die RMI1-Konstrukte anhand der PPT-Resistenz auf Homozygotie getestet werden.

Für die weiteren Arbeiten wurden nur transgene Linien verwendet, die sowohl *single-locus* und homozygot in Bezug auf das eingebrachte Konstrukt waren, das Reporterkonstrukt IC9C homozygot trugen und auch die Mutation im Genlocus *AtRMI1* hemizygot (*rmi1-1*) beziehungsweise homozygot (*rmi1-2*) enthielten.

Die verschiedenen Untersuchung der fünf *RMI1*-Varianten in *Atrmi1-2* IC9C wurde mit jeweils vier transgenen Linien pro Konstrukt durchgeführt. Die Auswirkungen der jeweiligen Konstrukte auf den Wildtyp (IC9C) in Bezug auf die Sensitivität gegenüber Genotoxinen und die Rekombinationsrate wurden pro Konstrukt anhand von zwei genetisch verschiedenen Linien überprüft. Die Sensitivität gegenüber Cisplatin (5 und 10  $\mu\text{M}$ ) beziehungsweise die Sensitivität gegenüber MMS (40, 60, 80 und 100 ppm) ergab für die unterschiedlichen Konzentration des verwendeten Genotoxins ein vergleichbares Ergebnis, daher werden jeweils nur die Daten einer Genotoxinkonzentration (Cisplatin 10  $\mu\text{M}$ , MMS 60 ppm) angegeben. Die Bestimmung der Rekombinationsrate im IC9C-Hintergrund (Molinier *et al.*, 2004) erfolgte sowohl im uninduzierten Zustand, als auch nach Induktion von DNA-Schäden durch das Agens Cisplatin (3  $\mu\text{M}$ ). Das verwendete Reporterkonstrukt IC9C besteht aus zwei Teilfragmenten des Reportergens der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS), durch welche sich intermolekulare Rekombinationsereignisse nachweisen lassen (vgl. Abschnitt 2.14.7).

Für die Mutante *Atrmi1-1* wurden jeweils 2 transgene Linien auf den entsprechenden meiotischen Phänotyp der Mutante überprüft. Da die Ergebnisse zur cytologischen Untersuchung der Pollenmutterzellen beziehungsweise der Fertilität (Samenzahl pro Schote) übereinstimmten, werden nur die Ergebnisse einer repräsentativen Linie dargestellt.

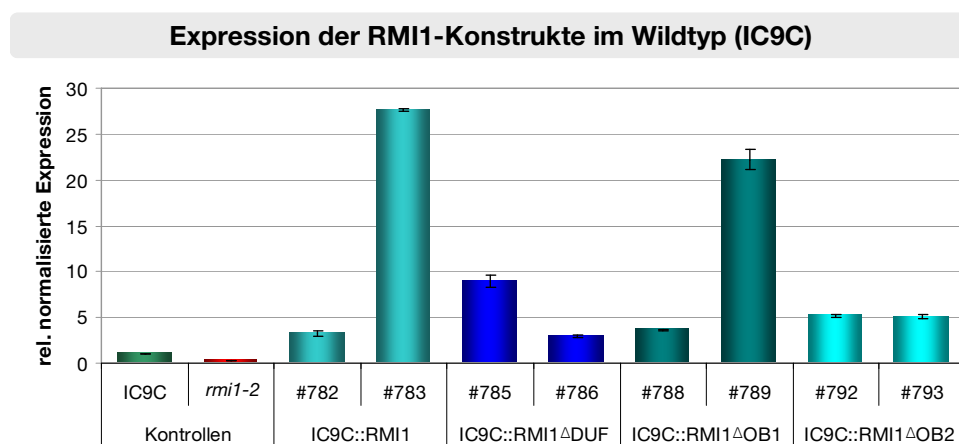
### 3.1.2 Expression der RMI1-Komplementationskonstrukte im Wildtyp

Um mögliche sekundäre Effekte aufgrund der Expression der verschiedenen *RMI1*-Konstrukte auf den Wildtyp (IC9C) ausschließen oder in die Bewertung der Ergebnisse miteinbeziehen zu können, wurden die Plasmide pRMI1, pRMI1 $\Delta$ DUF, pRMI1 $\Delta$ OB1 und pRMI1 $\Delta$ OB2 zusätzlich zu den beiden *Atrmi1*-Mutanten auch in den dazugehörigen Wildtyp (IC9C) transformiert.

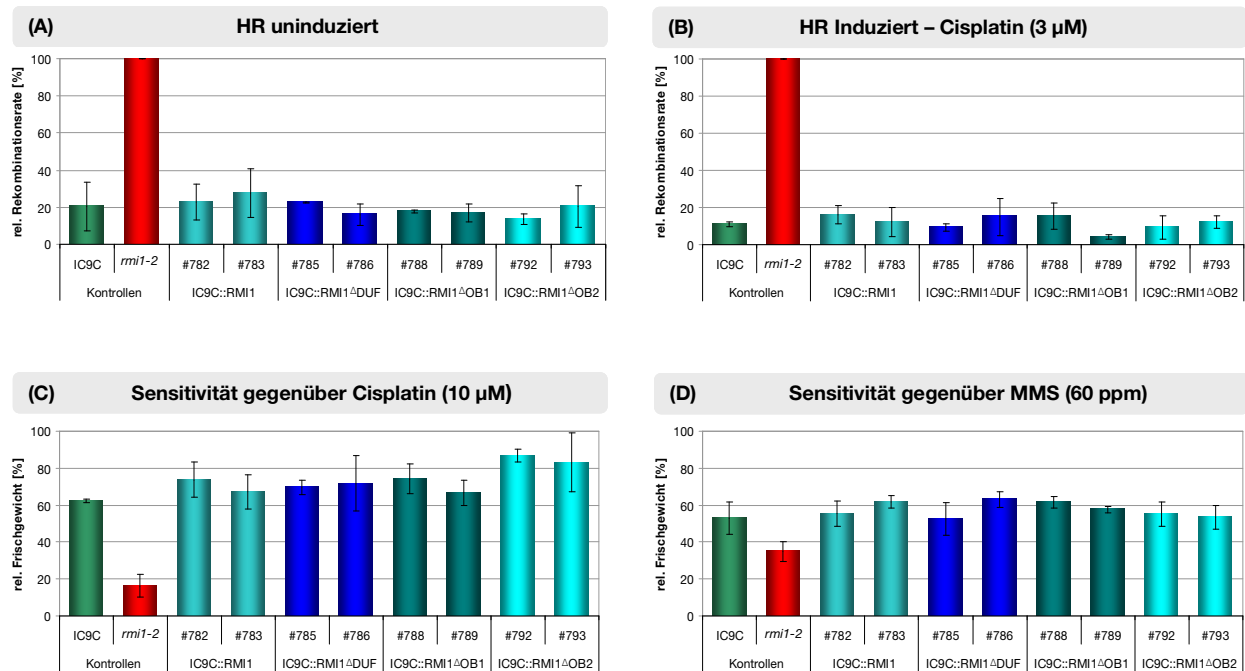
Zusätzlich zur T-DNA-vermittelten PPT-Resistenz wurde die Expression der *RMI1*-Konstrukte mit Hilfe von quantitativer Real-Time PCR ermittelt (vgl. Abschnitt 2.12.8). Durch die verwendete Primerkombination konnte die sowohl die Expression des natürlichen *AtRMI1* im Wildtyp und der *Atrmi1-2* Mutante, als auch die Expression der verschiedenen eingebrachten *RMI1*-Konstrukte nachgewiesen werden. Die relative normalisierte Expression der Konstrukte

in den etablierten Linien ist bezogen auf die Expression von *AtRMI1* im Wildtyp (IC9C) und in Abbildung 3.4 im Vergleich zur Expression von *AtRMI1* im Wildtyp und in *Atrmi1-2* dargestellt. Durch das Doppeldeletionskonstrukt  $pRMI1\Delta DUF\Delta OB1$  sollte bestätigt werden, dass im Gegensatz zu den einzelnen Deletionen der DUF1767 Domäne und der OB-fold Domäne 1 keinerlei Komplementation in der *Atrmi1-2* Mutante mehr erfolgt. Die Expression und auch die Auswirkungen des Konstruktes  $RMI1\Delta DUF\Delta OB1$  auf den Wildtyp (IC9C) wurde nicht getestet. Das verwendete Reporterkonstrukt IC9C dient der Bestimmung der somatischen Rekombinationsrate anhand der Restaurierung eines funktionellen *GUS*-Gens aus zwei nicht funktionellen *GUS*-Fragmenten. Diese Ereignisse lassen sich anhand der Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase nachweisen, da diese in der Lage ist das Substrat X-GlcA in einen blauen unlöslichen Farbstoff umzusetzen. Aus jeder Transformation wurden mehrere homozygote *single-locus* Linien etabliert, die sich jeweils im Integrationsort des *RMI1*-Konstruktes unterschieden.

Im Vergleich zum Wildtyp (IC9C) zeigt die *Atrmi1-2* Mutante eine deutlich erhöhte Rekombinationsrate. Durch die Behandlung mit dem Genotoxin Bleomycin, wird diese zwar noch weiter erhöht, das Verhältnis zum Wildtyp bleibt aber gleich (Hartung *et al.*, 2008). Der selbe Effekt konnte auch bereits für die Verwendung von Cisplatin zur Induktion von DNA-Schäden bei der Bestimmung der somatischen Rekombinationsfrequenz von *Atrecq4A* beschrieben werden, welches ebenfalls Bestandteil des RTR-Komplexes ist (Schröpfer, 2012). Sowohl die Untersuchung der somatischen intermolekularen Rekombinationsfrequenz (uninduziert, Cisplatin-induziert), als auch die Sensitivität gegenüber den Genotoxinen Cisplatin und MMS, zeigten keine Veränderungen der etablierten Linien im Vergleich zum Wildtyp (IC9C) (vgl. Abbildung 3.5). Getestet wurden hierfür jeweils zwei Linien mit den Konstrukten  $pRMI1$ ,  $pRMI1\Delta DUF$ ,  $pRMI1\Delta OB1$  und  $pRMI1\Delta OB2$  im WT mit IC9C-Hintergrund. Die Linien IC9C:: $RMI1\Delta DUF\Delta OB1$  befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse noch in der T3 Generation und konnten nicht getestet werden.



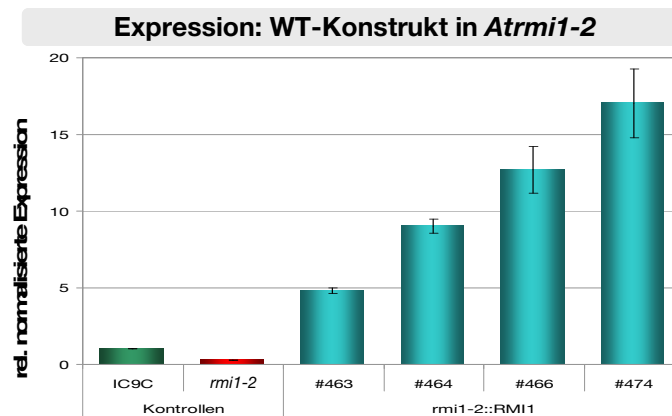
**Abb. 3.4: Relative normalisierte Expression der verschiedenen *RMI1*-Konstrukte im Wildtyp (IC9C).** Die Expression der *RMI1*-Konstrukte (*RMI1*,  $RMI1\Delta DUF$ ,  $RMI1\Delta OB1$  und  $RMI1\Delta OB2$ ) im Wildtyp wurde anhand quantitativer Real-Time-PCR ermittelt. Die relative normalisierte Expression des Konstruktes ist bezogen auf die natürlichen Expression von *AtRMI1* in IC9C.



**Abb. 3.5: Auswirkungen der RMI1-Komplementationskonstrukte auf den Wildtyp (IC9C).** Die klonierten RMI1-Konstrukte pRMI1, pRMI1 $\Delta$ DUF, pRMI1 $\Delta$ OB1 und pRMI1 $\Delta$ OB2 wurden zur Untersuchung des Einflusses auf den Wildtyp in die Reporterlinie IC9C transformiert. Es wurden je Konstrukt zwei homozygote *single locus* Linien bezüglich der Auswirkungen der exprimierten RMI1-Varianten auf die somatische Rekombination (A,B) und auf die Sensitivität gegenüber der Genotoxine Cisplatin (C) und MMS (D) untersucht. In den verwendeten Linien lässt sich aufgrund der Expression der Konstrukte keine starke Abweichung vom Phänotyp des Wildtyps feststellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Bestimmung der spontanen somatischen Rekombinationsrate (A), sowie die somatische Rekombinationsrate nach Induktion von DNA-Schäden durch Cisplatin (B) anhand des Reporterkonstruktes IC9C. Das Frischgewicht der Pflanzen ist nach einer Behandlung mit Cisplatin (10  $\mu$ M) (C) oder MMS (60 ppm) (D) dargestellt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgt relativ, bezogen auf die erhöhte Rekombinationsrate der *Atrmi1-2* Mutante (100%) oder auf das Frischgewicht der jeweiligen unbehandelten Probe.

### 3.1.3 Komplementation der somatischen Phänotypen von *Atrmi1-2* mit dem Konstrukt *RMI1*

Das eingebrachte cDNA-Konstrukt pRMI1 führt zur Bildung eines 644 AS langen RMI1-Proteins, das identisch zum natürlichen *AtRMI1* ist. Die Expression von *RMI1* des Konstrukts wurde mit Hilfe von quantitativer Real-Time PCR für 14 Tage alte Pflanzen der verwendeten Linien analysiert und mit der natürlichen Expression des intakten RMI1 aus dem Wildtyp (IC9C) verglichen. Es konnten unterschiedliche Expressionsstärken des Konstruktes in den genetisch verschiedenen Linien *rmi1-2* IC9C::RMI1 #463, #464; #466 und #474 festgestellt werden. In Abbildung 3.6 sind die ermittelten normalisierten Expressionswerte bezogen auf die *AtRMI1*-Expression im Wildtyp angegeben. Zum Vergleich ist auch die Expression von *RMI1* in der *Atrmi1-2* Mutante dargestellt.

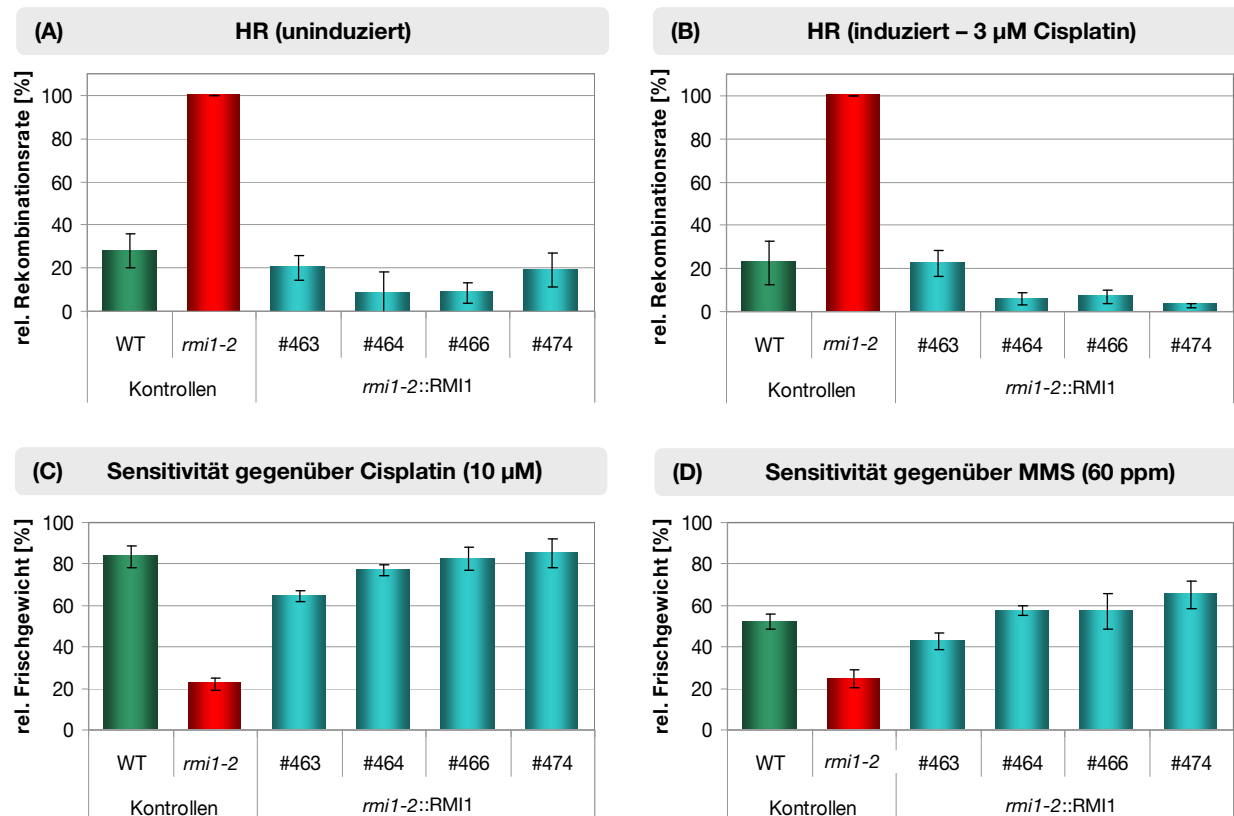


**Abb. 3.6: Relative normalisierte Expression des WT-Konstruktes *RMI1* in *Atrmi1-2*.** Die Expression des von *RMI1* des Konstruktes in der Mutante *Atrmi1-2* wurde anhand quantitativer Real-Time PCR ermittelt. Die relative normalisierte Expression des Konstruktes ist bezogen auf die natürliche Expression von *AtRMI1* in IC9C. Zum Vergleich ist auch die Expression des trunkeierten *RMI1* in *Atrmi1-2* dargestellt.

Die Komplementation der verschiedenen Phänotypen der *Atrmi1-2* Mutante stellt eine wichtige Grundlage für die Einordnung der Ergebnisse der verschiedenen Deletionskonstrukte dar.

Die vollständige Aufhebung des hyperrekombinativen Phänotyps der *rmi1-2* Mutante erfolgt durch die Expression des vollständigen RMI1 in den vier etablierten Linien. Nach Induktion von DNA-Schäden durch Cisplatin zeigen drei der untersuchten Linien (#464, #466, #474) eine geringere Rekombinationsrate als der Wildtyp. In diesen Linien ist die Expression des RMI1 des Konstruktes im Vergleich zur Linie #463 deutlich erhöht. Die Expression der Linie #463 ist aber ausreichend um den hyperrekombinativen Phänotyp der Mutante vollständig aufzuheben. Das rekombinante RMI1-Protein ist also in der Lage die natürliche Funktion von *AtRMI1* bezüglich der Unterdrückung der somatischen HR zu übernehmen (vgl. Abbildung 3.7).

Zum somatischen Phänotyp der *rmi1-2* Mutante gehört ebenfalls die erhöhte Sensitivität gegenüber den DNA-schädigenden Agenzien Cisplatin und MMS. Die *rmi1-2* Mutanten zeigen ein stark reduziertes Wachstum, nach zwei Wochen Inkubation in Flüssigmedium mit 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M Cisplatin beziehungsweise mit 40, 60, 80 und 100 ppm MMS. In den Linien #464, #466 und #474 kann auch hier der hypersensitive Phänotyp der *Atrmi1-2* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp vollständig komplementiert werden. Die Linie *rmi1-2* IC9C::*RMI1* #463, mit einer geringeren Expression des *RMI1* des Konstruktes im Vergleich zu den Linien #464, #466 und #474 zeigt eine leicht erhöhte Sensitivität sowohl gegenüber MMS, als auch Cisplatin, ist aber deutlich vom Wachstumsverhalten der Mutante zu unterscheiden. In Bezug auf die Komplementation scheint eine geringere Expression des RMI1-Konstruktes, die Vollständigkeit der Komplementation des hypersensitiven Phänotyps der *rmi1-2* Mutante zu beeinflussen, nicht aber auf den hyperrekombinativen Phänotyp. Dieser lässt sich mit einer schwachen Expression des rekombinanten RMI1 Proteins komplementieren.



**Abb. 3.7: Komplementation der *Atrmi1-2* Mutante mit dem Konstrukt *RMI1*.** Aus der Transformation der *Atrmi1-2* Mutante mit dem Plasmid pRMI1 wurden mehrere genetisch verschiedene transgene Linien etabliert. Vier dieser Linien wurden auf die Phänotypen der *rmi1-2* Mutante bezüglich erhöhter Rekombinationsrate (A, B) und erhöhter Sensitivität gegenüber Cisplatin (10  $\mu$ M) (C) und MMS (60 ppm) (D) untersucht. Zum Vergleich wurden jeweils die Kontrollen WT (IC9C) und die *rmi1-2* Mutante mit angegeben. Alle untersuchten Linien befinden sich im IC9C-Hintergrund zur Bestimmung der somatischen Rekombinationsrate. Die Ermittlung der Rekombinationsrate erfolgte sowohl nach Induktion von DNA-Schäden durch Cisplatin (3  $\mu$ M) (B) als auch uninduziert (A). Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Daten relativ in Bezug auf die Rekombinationsrate der Mutante (100%) betrachtet. Eine Komplementation des hyperrekombinativen *rmi1-2* Phänotyps ist mit allen transgenen Linien durch die Expression des rekombinanten *RMI1* möglich. Die Ermittlung der Sensitivität erfolgte anhand des Frischgewichts von jeweils 10 Pflanzen nach 14 Tagen in flüssigem GM mit der entsprechenden Endkonzentration an MMS (60 ppm) oder Cisplatin (10  $\mu$ M). Das relative Frischgewicht wurde durch drei unabhängige Experimente anhand des Gewichts einer unbehandelten Probe der jeweiligen Linie ermittelt. Es konnte durch die Transformation mit pRMI1 eine vollständige Komplementation in 3 Linien (#464, #466, #474) erreicht werden. Das Wachstum der Linie #463 ist auch mit Komplementationskonstrukt leicht reduziert, aber deutlich von Frischgewicht der Mutante zu unterscheiden.

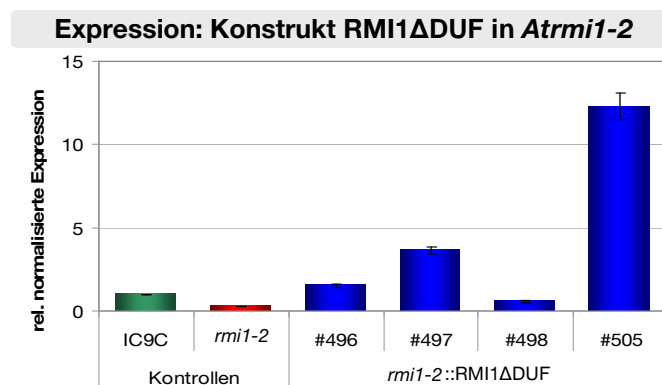
### 3.1.4 Funktion der DUF1767 Domäne im N-Terminus

Zur Untersuchung der Funktion der DUF1767 Domäne in Bezug auf die unterschiedlichen Phänotypen der *Atrmi1-2* Mutante wurde das Konstrukt pRMI1 $\Delta$ DUF kloniert und in die Mutante *rmi1-2* transformiert. Aus dem Saatgut dieser Transformation wurden mehrere Linien mit unterschiedlichem Integrationsort des Konstruktes etabliert. Das exprimierte Konstrukt zeichnet sich durch die Deletion der DUF1767 Domäne im N-Terminus aus und resultiert in einem Protein mit 550 AS. In Abbildung 3.8 sind die Werte der relativen normalisierten

Expression von *RMI1* der vier etablierten Linien *rmi1-2* IC9C::*RMI1ΔDUF* (#496, #497, #498 und #505) bezogen auf das Expressionsniveau im Wildtyp IC9C dargestellt.

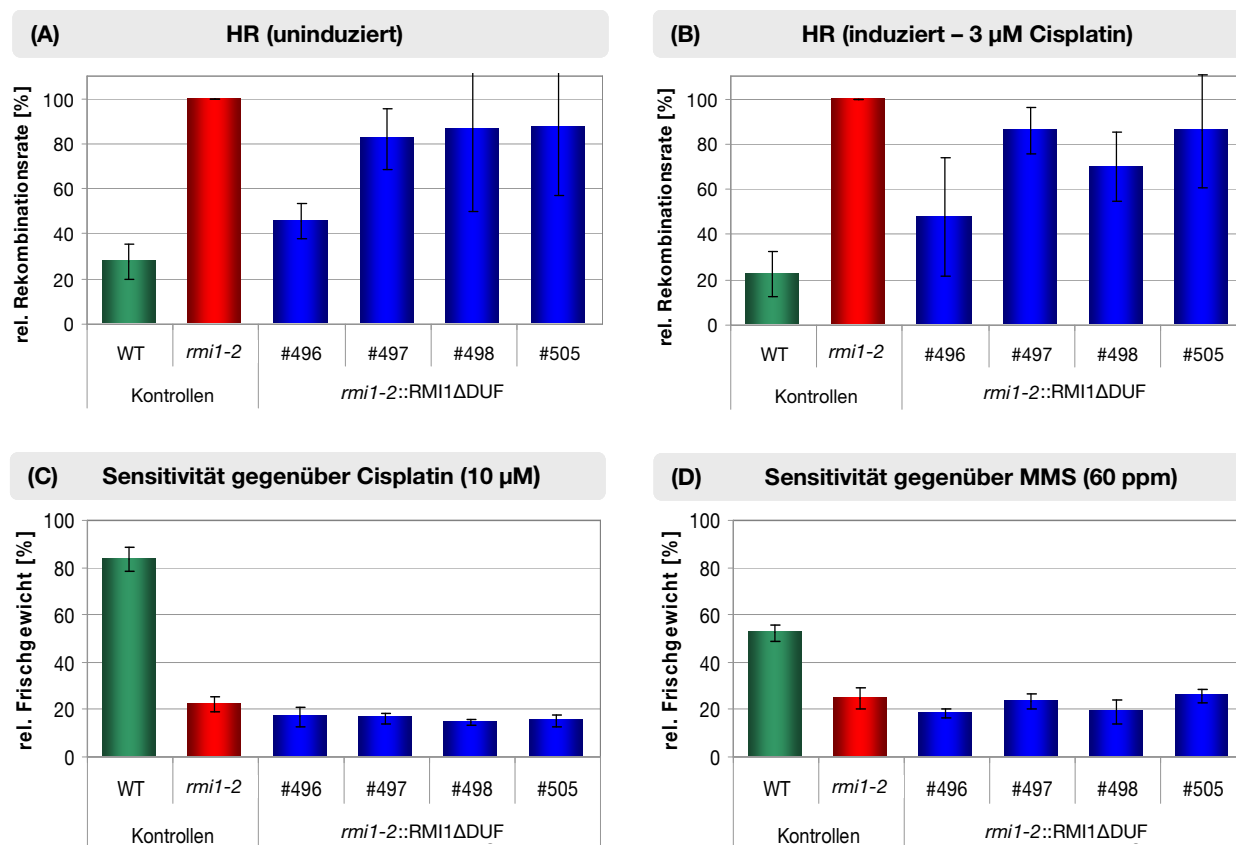
In Bezug auf den hyperrekombinativen Phänotyp der *Atrmi1-2* Mutante sind im uninduzierten Zustand zunächst zwei Linien (#496, #497) zu erkennen, deren Rekombinationsrate intermediär zum Wildtyp und zur Mutante liegt (vgl. Abbildung 3.9). Nach Induktion mit Cisplatin ist es aufgrund einer geringeren Standardabweichung möglich drei (#496, #497, #498) der vier getesteten Linien diesem intermediären Phänotyp zuzuordnen. Die Rekombinationsrate der Linie #505 entspricht weiterhin der von *Atrmi1-2*.

In Bezug auf die Sensitivität gegenüber Cisplatin (10  $\mu$ M) und MMS (60 ppm) führt das rekombinante *RMI1* Protein mit der deletierten *DUF1767* Domäne zu keiner Komplementation des hypersensitiven Phänotyps der *Atrmi1-2* Mutante. Alle vier untersuchten Linien zeigen eine unveränderte erhöhte Sensitivität gegenüber den Genotoxinen Cisplatin und MMS im Vergleich zum Wildtyp. Demnach ist die *DUF1767* Domäne essentiell für die Reparatur von Schäden, die durch Cisplatin und MMS verursacht werden.



**Abb. 3.8: Relative normalisierte Expression von *RMI1ΔDUF* des Deletionskonstruktes in *Atrmi1-2*.** Die Expression von *RMI1* des *RMI1ΔDUF* Konstruktes in der Mutante *Atrmi1-2* wurde anhand quantitativer Real-Time-PCR ermittelt. Die relative normalisierte Expression des Deletionskonstruktes *RMI1ΔDUF* ist bezogen auf die natürliche Expression von *AtRMI1* in IC9C. Zum Vergleich ist auch die Expression des trunkeierten *RMI1* in *Atrmi1-2* dargestellt. Die Expressionswerte wurden durch drei unabhängige Wiederholungen ermittelt.





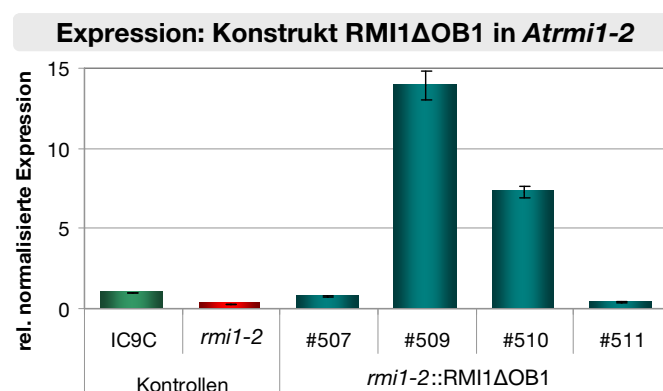
**Abb. 3.9: Komplementation der *Atrmi1-2* Mutante mit dem Deletionskonstrukt *RMI1ΔDUF*.** Die Expression von *RMI1ΔDUF* resultiert in einem rekombinanten *RMI1* Protein von 550 AS mit einer Deletion im N-Terminus, die den Bereich der DUF1767 Domäne umfasst. Dargestellt sind die Ergebnisse zur somatischen Rekombination (uninduziert (A) bzw. Cisplatin-induziert (B)) und der Sensitivität gegenüber Cisplatin (C) und MMS (D) jeweils im Vergleich zum Wildtyp (IC9C) und zur *rmi1-2* Mutante. Die Auswertung der somatischen Rekombination erfolgte relativ zur Rekombinationsrate der *rmi1-2* Mutante. Durch das *RMI1* Protein mit Deletion der DUF1767 Domäne konnte keine vollständige Komplementation des hyperrekombinativen *rmi1-2* Phänotyps erreicht werden. Im uninduzierten Zustand zeigen zwei (#496, #497) der vier getesteten Linien einen intermediären Phänotyp. Nach einer Behandlung mit Cisplatin konnten durch eine kleinere Standardabweichung drei (#496, #497, #498) der vier Linien diesem intermediären Phänotyp zugewiesen werden. In Bezug auf die Sensitivität ist keine Veränderung der etablierten Komplementationslinien im Vergleich zur Mutante auszumachen.

### 3.1.5 Funktion der OB-fold Domäne 1 im N-Terminus

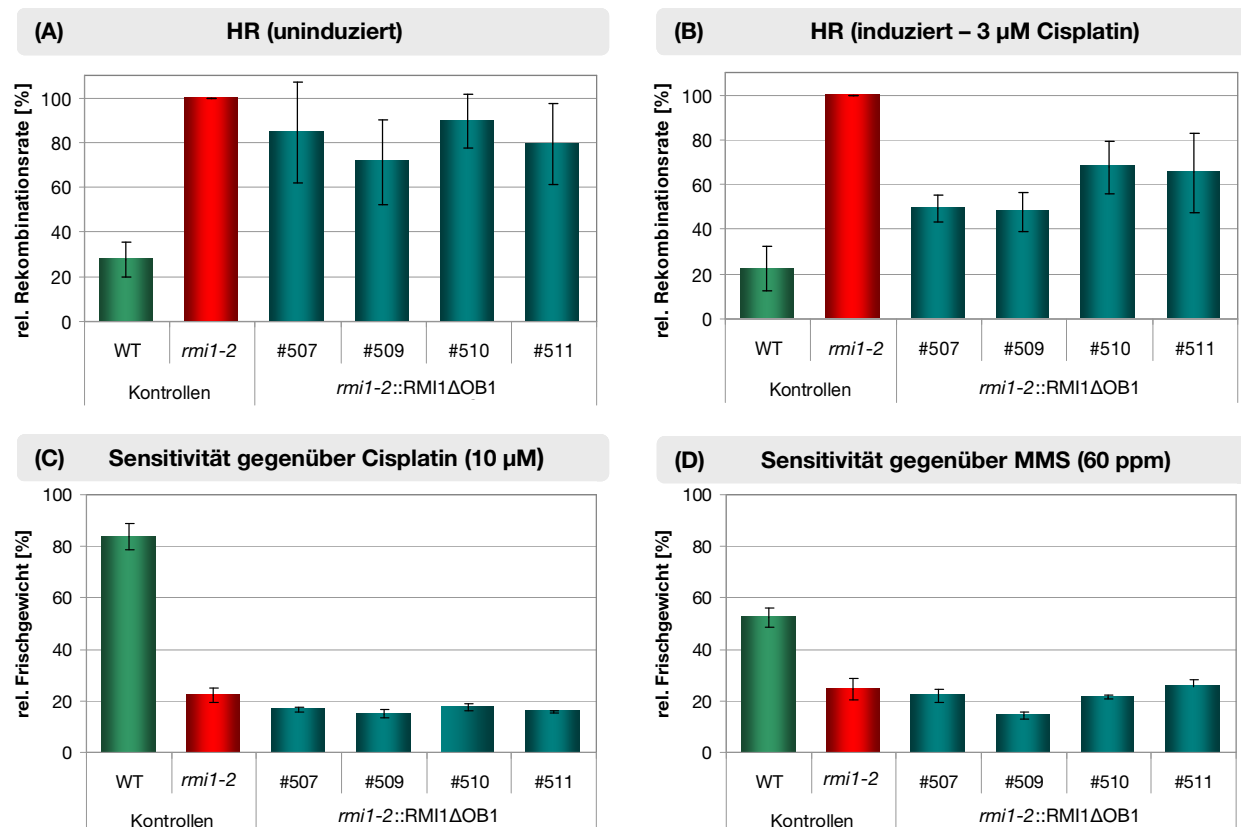
Um auch die Funktion der OB-fold Domäne 1 näher einordnen zu können, wurde das Deletionskonstrukt *pRMI1ΔOB1* kloniert, in dem der konservierte Bereich der OB-fold Domäne 1 nicht enthalten war. Dieses Konstrukt wurde in die Mutante *Atrmi1-2* im IC9C-Hintergrund über Agrobakterien-vermittelte Transformation eingebracht. Die Expression des Konstruktes erfolgt durch die natürliche Promotor- und Terminatorsequenz und resultiert in einem Protein mit 619 AS. Nach der Etablierung mehrerer genetisch verschiedener *single-locus* Linien wurden vier Linien, die das *RMI1ΔOB1* Konstrukt homozygot enthielten, in der T4-Generation zur Ermittlung der Expression von *RMI1ΔOB1* Konstruktes, sowie zur Untersuchung der somatischen HR und der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien verwendet (vgl. Abbildung 3.10 und 3.11).

Die ermittelten Expressionsdaten von *AtRMI1* in den Linien *rmi1-2* IC9C::*RMI1ΔOB1* wurden auf das natürliche Expressionslevel von *AtRMI1* im Wildtyp bezogen. Zum Vergleich der etablierten Linien wurde ebenfalls die Expression in *Atrmi1-2* gemessen. Die Expressionslevel der etablierten Linien #507, #509, #510 und #511 sind im Vergleich zur Mutante erhöht. In den Linien #507 und #511 wird aber durch die Expression des Konstrukts *RMI1ΔOB1* nicht das natürliche *AtRMI1*-Expressionsniveau erreicht (vgl. Abbildung 3.10).

Die Auswertung der Rekombinationsdaten der vier *rmi1-2* IC9C::*RMI1ΔOB1* Linien ergab keine Komplementation des hyperrekombinativen Phänotyps der *rmi1-2* Mutante (vgl. Abbildung 3.11). Ohne die Induktion von DNA-Addukten durch Cisplatin konnte für zwei (#509, #511) der getesteten Linien eine leicht reduzierte Rekombinationsrate im Vergleich zur *rmi1-2* Mutante festgestellt werden. Durch die Analyse der Rekombinationsrate nach Behandlung mit Cisplatin (3  $\mu$ M) konnten alle vier getesteten Komplementationslinien einem Rekombinationsphänotyp zugewiesen werden, der intermediär zur Rekombinationsrate des Wildtyps und der Mutante liegt. Auch die Linien #507 und #511, die eine geringe Expression des eingebrachten Deletionskonstruktes *RMI1ΔOB1* aufweisen, zeigen eine vergleichbare Rekombinationsrate wie die Linien #509 und #511 mit einer höheren Expression des Konstruktes. Im Gegensatz zur Komplementation des Rekombinationsphänotyps, sind die Ergebnisse der Sensitivitätstests eindeutig dem Phänotyp der *rmi1-2* Mutante zuzuordnen. Die Expression von *RMI1ΔOB1* ermöglicht also keine Aufhebung des hypersensitiven Phänotyps. Alle vier getesteten *rmi1-2* IC9C::*RMI1ΔOB1* Linien zeigen weiterhin das reduzierte Wachstum von *Atrmi1-2* im Vergleich zum Wildtyp (IC9C). Die Ermittlung der Daten zur Sensitivität gegenüber Cisplatin (10  $\mu$ M) und MMS (60 ppm) erfolgte in drei unabhängigen Experimenten, wobei jede Linie relativ zu einer unbehandelten Probe ausgewertet wurde, die Ergebnisse der drei Ansätze wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet.



**Abb. 3.10: Relative normalisierte Expression des Deletionskonstruktes *RMI1ΔOB1* in *Atrmi1-2*.** Die Expression des *RMI1ΔOB1* Konstruktes in der Mutante *Atrmi1-2* wurde anhand quantitativer Real-Time-PCR (N = 3) ermittelt. In dieser Abbildung ist die relative normalisierte Expression von *RMI1ΔOB1* bezogen auf die natürliche Expression von *AtRMI1* in IC9C. Zum Vergleich ist auch die Expression des trunkierten *RMI1* in *Atrmi1-2* dargestellt. In den Linien #507 und #511 konnte nur eine schwache *RMI1ΔOB1* Expression detektiert werden, diese liegt aber über dem der *Atrmi1-2* Mutante.



**Abb. 3.11: Komplementation der *Atrmi1-2* Mutante mit *RMI1ΔOB1*.** Die Transformation des Konstruktes *RMI1ΔOB1* erfolgte in die *Atrmi1-2* Mutante, die sich durch einen hyperrekombinativen und hypersensitiven Phänotyp auszeichnet. In Bezug auf die somatische Rekombination, ohne Induktion von DNA-Schäden, konnte bei zwei (#509, #511) der vier etablierten Komplementationslinien *rmi1-2xIC9C::RMI1ΔOB1* eine leichte Reduktion der Rekombinationsrate ermittelt werden (A). Nach der Induktion von DNA-Schäden durch die Behandlung der Pflanzen mit Cisplatin (3 µM), konnte für alle vier Linien ein Reduktion der Rekombinationsrate auf etwa die Hälfte festgestellt werden (B). Die Darstellung der Rekombinationsrate erfolgt relativ zur *rmi1-2* Mutante. Die aus den drei durchgeführten unabhängigen Experimenten berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken den Mittelwerten der einzelnen Linien zugeordnet. Die Bestimmung der Sensitivität der etablierten Linien erfolgte ebenfalls in drei unabhängigen Experimenten. Es wurde jeweils das Frischgewicht der mit Cisplatin beziehungsweise MMS behandelten Pflanzen relativ zum Frischgewicht der unbehandelten Pflanzen berechnet. Der hypersensitive Phänotyp der *Atrmi1-2* Mutante konnte nicht komplementiert werden.

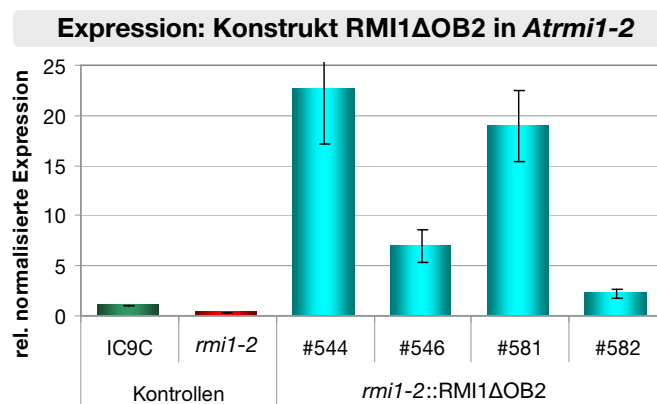
### 3.1.6 Funktion der OB-fold Domäne 2 im C-Terminus

Zur Untersuchung der Funktion der OB-fold Domäne 2 von *AtRMI1* wurde ein Deletionskonstrukt erstellt, indem der konservierte Bereich der OB-fold Domäne 2 entfernt war (vgl. Abbildung 3.2). Durch die Deletion des C-Terminus entsteht nach der Expression des Konstruktes *RMI1ΔOB2* ein rekombinantes Protein mit 484 AS. Da mit den anfangs getesteten vier *rmi1-2 IC9C::RMI1ΔOB2* Linien nur partiell eine Komplementation erreicht werden konnte, wurden insgesamt elf homozygote *single-locus* Linien etabliert und untersucht. Zur besseren Übersichtlichkeit der gesammelten Daten werden hier die Ergebnisse von 4 repräsentativen Linien gezeigt. Für diese Linien wurde ebenfalls die Expression von *RMI1ΔOB2* des Deletionskonstruktes ermittelt und in Bezug auf die Expression des natürlichen *AtRMI1* in

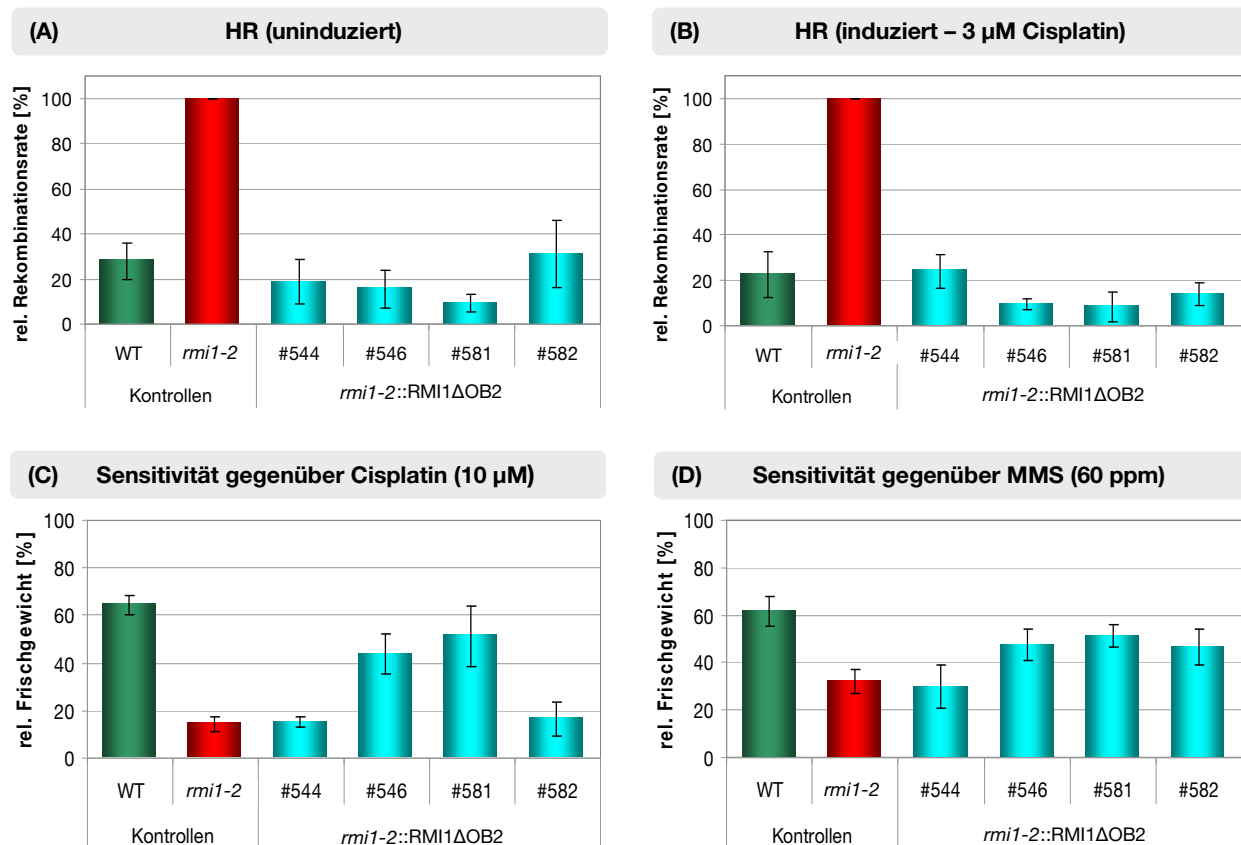
Abbildung 3.12 dargestellt. In den vier getesteten Linien *rmi1-2* IC9C::*RMI1ΔOB2* konnte eine erhöhte Expression im Vergleich zur *Atrmi1-2* Mutante und auch zum Wildtyp festgestellt werden.

Da die *rmi1-2* Mutante eine erhöhte Rekombinationsfrequenz, sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Genotoxine Cisplatin und MMS zeigt, wurden die elf etablierten Linien auf diese Phänotypen hin untersucht. Zur Feststellung der Rekombinationsrate diente das GUS-Reporterkonstrukt. Die Ergebnisse zur somatischen Rekombination zeigen, dass das rekombinante Protein *RMI1ΔOB2* in der Lage ist die Funktion des natürlichen *AtRMI1* zu übernehmen (vgl. Abbildung 3.13). Die Rate der somatischen HR entspricht nach der Expression des *RMI1ΔOB2* Proteins wieder der des Wildtyps.

In Bezug auf die erhöhte Sensitivität der *Atrmi1-2* Mutante gegenüber Cisplatin und MMS bewirkt die Expression von *RMI1ΔOB2* nur partiell eine Komplementation. Nach der Behandlung mit 10 µM Cisplatin über einen Zeitraum von 14 Tagen, weisen zwei (#544, #581) der vier Linien einen intermediären Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp beziehungsweise zur Mutante *Atrmi1-2* auf. Durch die Bestimmung der Sensitivität gegenüber MMS lassen sich drei der getesteten Linien (#544, #581, #582) einem intermediären Phänotyp zuordnen. Damit ist gezeigt, dass der C-terminale Bereich, der die OB-fold-Domäne 2 umfasst eine Rolle in der Reparatur von Cisplatin- beziehungsweise MMS-verursachten Schäden übernimmt, dafür aber nicht essentiell ist.



**Abb. 3.12: Relative normalisierte Expression von *RMI1* des Deletionskonstruktes *RMI1ΔOB2* in *Atrmi1-2*.** Die Expression von *RMI1* des *RMI1ΔOB2* Konstruktes in der Mutante *Atrmi1-2* wurde anhand quantitativer Real-Time-PCR ermittelt. Es ist die relative normalisierte Expression von *AtRMI1* bezogen auf die natürlichen Expression von *AtRMI1* in IC9C dargestellt. Zum Vergleich ist auch die Expression des trunkeierten *RMI1* in *Atrmi1-2* abgebildet. Die etablierten Linien #544, #546, #581 und #582 weisen ein im Vergleich zum Wildtyp und zur Mutante erhöhtes *RMI1*-Expressionslevel auf.

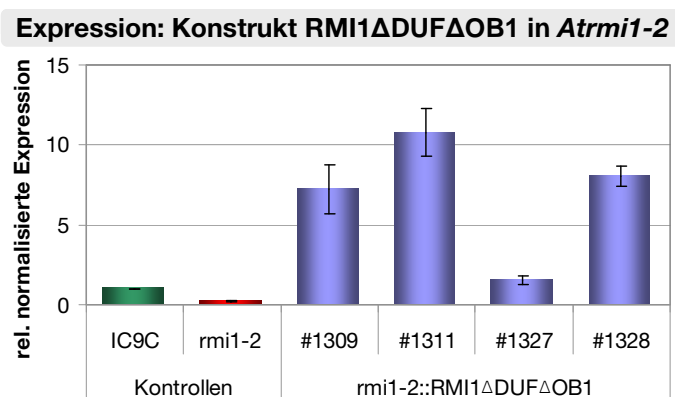


**Abb. 3.13: Komplementation der *Atrmi1-2* Mutante mit *RMI1ΔOB2*.** Die hyperrekombinative und hypersensitive Mutante *Atrmi1-2* wurde mit dem Konstrukt *RMI1ΔOB2* transformiert. Dieses Konstrukt weist eine Deletion des C-terminalen Bereichs auf, der die OB-fold Domäne 2 umfasst. In allen verwendeten Linien befindet sich ein Reporterkonstrukt aus 2 nicht funktionellen GUS-Fragmenten zum Nachweis intermolekularer Rekombinationsereignisse, anhand dessen die Auswirkung des rekombinanten Proteins *RMI1ΔOB2* festgestellt werden können. In Bezug auf die somatische Rekombination konnte eine Komplementation des hyperrekombinativen Phänotyps der *rmi1-2* Mutante sowohl ohne Induktion von DNA-Addukten (A), als auch mit Induktion durch Cisplatin (3  $\mu$ M) (B) durch die Expression des *RMI1ΔOB2* Konstrukts erreicht werden. Die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Rekombinationstests wurden relativ zur Rekombinationsrate der *rmi1-2* Mutante ausgewertet. Der hypersensitive Phänotyp der *rmi1-2* Mutante kann dagegen nur partiell aufgehoben werden. Zwei der gezeigten Linien mit dem Deletionskonstrukt *RMI1ΔOB2* weisen einen intermediären Phänotyp nach Behandlung mit Cisplatin (10  $\mu$ M) (C) beziehungsweise MMS (60 ppm) (D) auf.

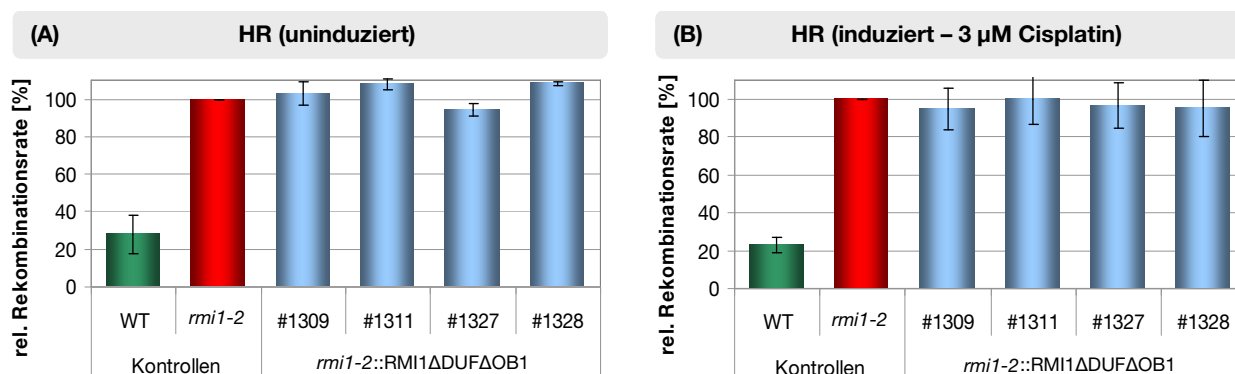
### 3.1.7 Funktion des N-Terminus (DUF1767 und OB-fold Domäne 1)

Aufgrund der nicht vollständigen Komplementation des hyperrekombinativen Phänotyps der *Atrmi1-2* Mutante durch die Expression von *RMI1ΔDUF* beziehungsweise *RMI1ΔOB1* wurde ein weiteres Konstrukt kloniert (vgl. Abschnitt 3.1.4 und 3.1.5). Das Plasmid *pRMI1ΔDUFΔOB1* enthält die cDNA Sequenz von *AtRMI1* ohne die DUF1767 Domäne und OB-fold Domäne 1 (vgl. Abbildung 3.2). Nach der Transformation des Plasmids *pRMI1ΔDUFΔOB1* in *Atrmi1-2* konnten mehrere genetisch verschiedene Linien identifiziert werden. Daraus wurden mehrere *single-locus* Linien ermittelt, die bereits in der T3-Generation sowohl auf das homozygote Vorliegen des *RMI1ΔDUFΔOB1* Konstruktes getestet wurden, als auch auf die Auswirkungen des rekombinanten Proteins auf die somatische HR der *rmi1-2* Mutante. Da bereits die

Deletion einer der beiden Domänen keine Komplementation des hypersensitiven *rmi1-2* Phänotyps ermöglicht, wurde die Auswirkung des rekombinanten Proteins *RMI1ΔDUFΔOB1* nur auf die Frequenz der somatischen Rekombination untersucht. Auch für die Expression des *RMI1ΔDUFΔOB1* Konstrukt wurde eine erhöhte Expression in Bezug auf die natürliche *AtRMI1* Expression ermittelt (vgl. Abbildung 3.14).



**Abb. 3.14: Relative normalisierte Expression des Deletionskonstruktes *RMI1ΔDUFΔOB1* in *Atrmi1-2*.** Die Expression von *RMI1ΔDUFΔOB1* in der Mutante *Atrmi1-2* wurde anhand quantitativer Real-Time-PCR ermittelt. Es ist die relative normalisierte Expression von *RMI1ΔDUFΔOB1* angegeben, bezogen auf die relative natürlichen Expression von *AtRMI1* in IC9C. Die etablierten Linien #1309, #1311, #1327 und #1328 weisen ein im Vergleich zum Wildtyp und zur Mutante erhöhtes Expressionslevel des rekombinanten *RMI1ΔDUFΔOB1* auf.



**Abb. 3.15: Komplementation der *Atrmi1-2* Mutante mit dem Deletionskonstrukt *RMI1ΔDUFΔOB1*.** Die hyperrekombinative Mutante *Atrmi1-2* wurde mit dem Konstrukt *RMI1ΔDUFΔOB1* transformiert. Dieses Konstrukt weist eine Deletion des N-terminalen Bereichs von *AtRMI1* auf, der sowohl die DUF1767 Domäne, als auch die OB-fold Domäne 1 umfasst. In Bezug auf die spontane (A) und Cisplatin-induzierte (B) somatische Rekombination konnte keine Komplementation des hyperrekombinativen Phänotyps der *rmi1-2* Mutante erreicht werden. Die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Rekombinationstests wurden relativ zur Rekombinationsrate der *rmi1-2* Mutante (100%) ausgewertet. Die berechnete Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

Durch das Einbringen des Konstruktes *RMI1ΔDUFΔOB1* in die Mutante konnte keine Komplementation des hyperrekombinativen *rmi1-2* Phänotyps erreicht werden (vgl. Abbildung 3.15). Daraus lässt sich schließen, dass der deletierte Bereich, der die DUF1767 Domäne und die OB-fold Domäne 1 umfasst, essentiell für die Funktion von *AtRMI1* in der somatischen HR ist. Dieses Ergebnis wurde durch jeweils drei unabhängige Experimente mit und ohne Induktion von DNA-Schäden durch Cisplatin (3 μM) ermittelt, dabei erfolgte die Auswertung der Daten relativ zur somatischen Rekombinationsfrequenz der Mutante *Atrmi1-2*.

### 3.1.8 Komplementation des meiotischen Phänotyps von *Atrmi1-1*

Die Mutante *Atrmi1-1* zeichnet sich durch eine Deletion von etwa 2 kb beginnend in Exon 1 aus. Diese Deletion führt ähnlich der *Atrmi1-2* Mutante zu einem hyperrekombinativen und hypersensitiven Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Des Weiteren sind homozygote *Atrmi1-1* Mutanten steril, weshalb die Vermehrung nur über segregierendes Saatgut möglich ist. Der sterile Phänotyp dieser Mutante weist auf eine wichtige Funktion von *RMI1* in der Meiose hin. Im Jahre 2008 wurde bereits der meiotische Defekt anhand cytologischer Untersuchungen von Pollenmutterzellen beschrieben (Chelysheva *et al.*, 2008; Hartung *et al.*, 2008), diese zeigten einen normalen Verlauf der Meiose bis zur Metaphase I, in der sich die gepaarten homologen Chromosomen (Bivalente) an der Äquatorialebene anordnen. Untersuchungen steriler *rmi1-1* Mutanten zeigten bereits hier erste Veränderungen, da teilweise mehr als fünf unförmige Bivalentstrukturen und Chromatinbrücken zwischen nicht homologen Chromosomen ausgebildet wurde. Die Anaphase I der meiosedefekten *rmi1* Mutanten wiesen starke Chromosomenfragmentierungen auf, worauf die Meiose zum Ende der ersten Reifeteilung abbricht. Meiotische Stadien der Meiose II konnten nicht beobachtet werden (Chelysheva *et al.*, 2008; Hartung *et al.*, 2008).

Die fünf *RMI1*-Konstrukte (vgl. Abbildung 3.2) wurden in die Mutantenlinie *Atrmi1-1* transformiert und anschließend mehrere homozygote *single-locus* Linien etabliert. Die ersten Ergebnisse der Komplementation konnten bereits in der T1-Generation nach der Selektion der genetisch verschiedenen Primärtransformanden gesammelt werden. Das Saatgut aus den Transformationen wurde auf PPT-haltigem Medium ausgebracht, um auf Pflanzen zu selektionieren, welche das *RMI1*-Konstrukt mit dem *BAR-ORF* enthielten. Diese Pflanzen wurden auf das Vorhandensein der *rmi1-1* Deletion mittels PCR-basierter Genotypisierung überprüft und bis zur Samenreife im Gewächshaus weitergezogen. Nach etwa fünf bis sechs Wochen konnten die Primärtransformanden identifiziert werden, deren Sterilität aufgehoben war (vgl. Tabelle 3.1). Aus jeder Transformation wurden zwischen 250 bis 300 Primärtransformanden genotypisiert. Eine Komplementation des sterilen Phänotyps war nur mit den Konstrukten *RMI1* und *RMI1ΔOB2* möglich. Durch die Expression des rekombinanten *RMI1* Proteins waren 98,4% der homozygoten *rmi1-1* Pflanzen wieder fertil. Die Expression des *RMI1ΔOB2* Konstruktes führte zu 98,1% fertilen *rmi1-1* Mutanten. In den *rmi1-1* Linien mit

den Konstrukten *RMI1ΔDUF*, *RMI1ΔOB1* und *RMI1ΔDUFΔOB1* konnte keine Komplementation des sterilen Phänotyps festgestellt werden. Daher konnten nur die Linien *rmi1-1::RMI1* und *rmi1-1::RMI1ΔOB2* mit homozygot vorliegender *rmi1-1* Mutation vermehrt werden, die Linien *rmi1-1::RMI1ΔDUF*, *rmi1-1::RMI1ΔOB1* und *rmi1-1::RMI1ΔDUFΔOB1* dagegen segregierend.

**Tabelle 3.1: Komplementation des sterilen Phänotyps der *Atrmi1-1* Mutante.** Nach der Transformation der RMI1-Komplementationskonstrukte wurde die T1-Generation anhand der PPT-Resistenz auf das Vorhandensein des RMI1-Konstruktes selektioniert und homozygote *rmi1-1* Mutanten durch PCR-basierte Genotypisierung ermittelt. Die etwa fünf bis sechs Wochen alten Pflanzen wurden auf ihre Fertilität hin überprüft. Die Expression der rekombinanten Proteine RMI1 beziehungsweise RMI1ΔOB2 führten zu fertilen homozygoten *rmi1-1* Mutanten. Nach der Expression der Konstrukte *RMI1ΔDUF*, *RMI1ΔOB1* und *RMI1ΔDUFΔOB1* waren die homozygoten *rmi1-1* Pflanzen weiterhin steril.

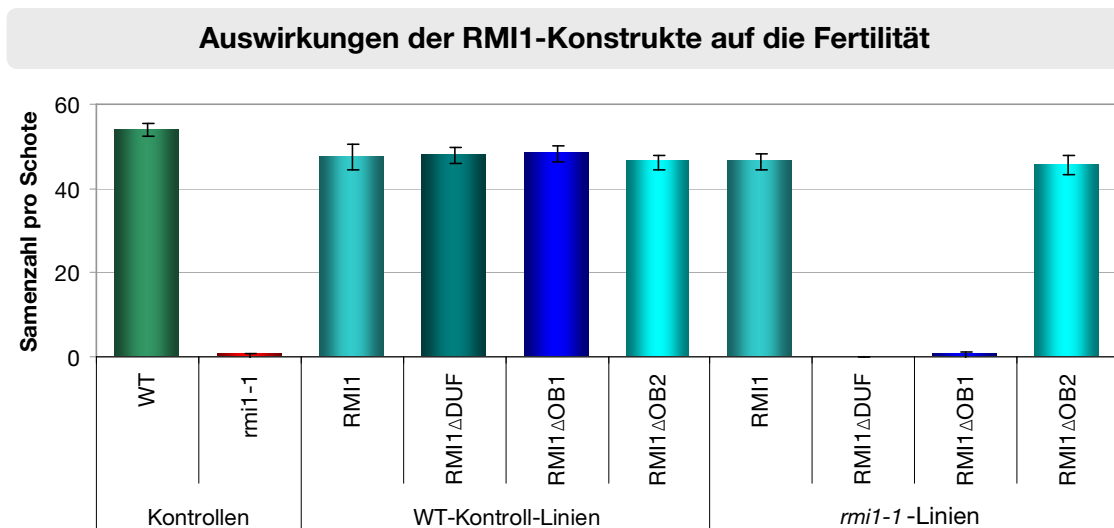
	<i>rmi1-1</i> -/-	fertile Pflanzen	fertile Pflanzen [%]
<i>rmi1-1</i>	58	0	0%
<i>rmi1-1::RMI1</i>	62	61	98,4%
<i>rmi1-1::RMI1ΔDUF</i>	52	0	0%
<i>rmi1-1::RMI1ΔOB1</i>	54	0	0%
<i>rmi1-1::RMI1ΔOB2</i>	52	51	98,1%
<i>rmi1-1::RMI1ΔDUFΔOB1</i>	49	0	0%

Des Weiteren wurde zur Überprüfung der Fertilität die Samenzahl pro Schote ermittelt (vgl. Abbildung 3.16). Hierzu wurden die Samenzahlen von jeweils fünf Schoten von fünf Pflanzen gemittelt, zum Vergleich ist die durchschnittliche Samenzahl einer unabhängigen Wildtyplinie und der *rmi1-1* Mutante angegeben. Auch hier konnte eine Komplementation der Sterilität nur mit den Konstrukten *RMI1* und *RMI1ΔOB2* erreicht werden. Die Samenzahlen der transformierten *rmi1-1* Mutanten liegen hier im selben Bereich wie die des transformierten Wildtyps. Die Linien *rmi1-1::RMI1ΔDUF* und *rmi1-1::RMI1ΔOB1* weisen wie die *rmi1-1* Mutante nur kurze, größtenteils leere Schoten auf. In der *rmi1-1* Mutante konnte in 25 Schoten insgesamt ein Samen und in der *rmi1-1::RMI1ΔOB1* zwei Samen gezählt werden. Diese Samen waren nicht keimungsfähig und auch optisch deutlich von vitalen Samen zu unterscheiden (vgl. Abbildung 3.17). Die Samenzahl der Linien *rmi1-1::RMI1ΔDUFΔOB1* und IC9C:: *RMI1ΔDUFΔOB1* konnten zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht ermittelt werden.

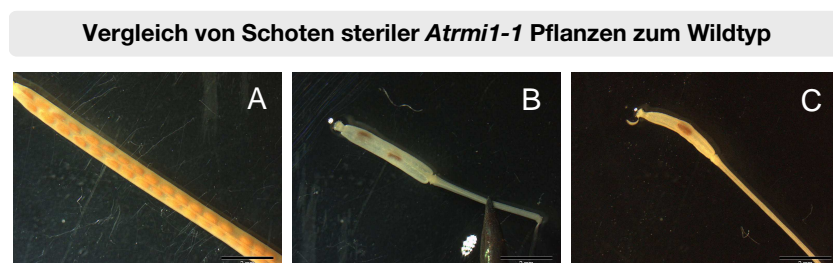
Die Komplementation der *Atrmi1-1* Mutante durch die Expression der rekombinanten *RMI1*-Varianten wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls durch cytologische Studien von Pollenmutterzellen untersucht (vgl. Abbildung 3.18, 3.19). Die Aufhebung des meiotischen Defektes der *Atrmi1-1* Mutante kann hierbei durch die Konstrukte *RMI1* und *RMI1ΔOB2* erreicht werden. Wie im Wildtyp erfolgt in den Meiozyten der etablierten Komplementationslinien die Anordnung der gepaarten homologen Chromosomen in Form von 5 Bivalentstrukturen an der Äquatorialebene während der Metaphase I. In der



anschließenden Anaphase I werden die homologen Chromosomen separiert und vollständig zu den gegenüberliegenden Polen gezogen. Im Gegensatz zur *Atrmi1-1* Mutante treten keine Chromosomenfragmentierungen auf, so dass die Zellen der komplementierten Linien *rmi1-1::RMI1* und *rmi1-1::RMI1ΔOB2*, vergleichbar mit dem Wildtyp, in die Meiose II eintreten. Auch im Verlauf der zweiten Reifeteilung konnten keine Auffälligkeiten wie Chromosomenfragmentierungen beobachtet werden. Die Trennung der Schwesterchromatiden führt zur Bildung von jeweils einer Chromatidengruppe an jedem der vier Zellpole, wie es in diesen beiden Linien zum Ende der Meiose II im Tetradenstadium beobachtet werden konnten.

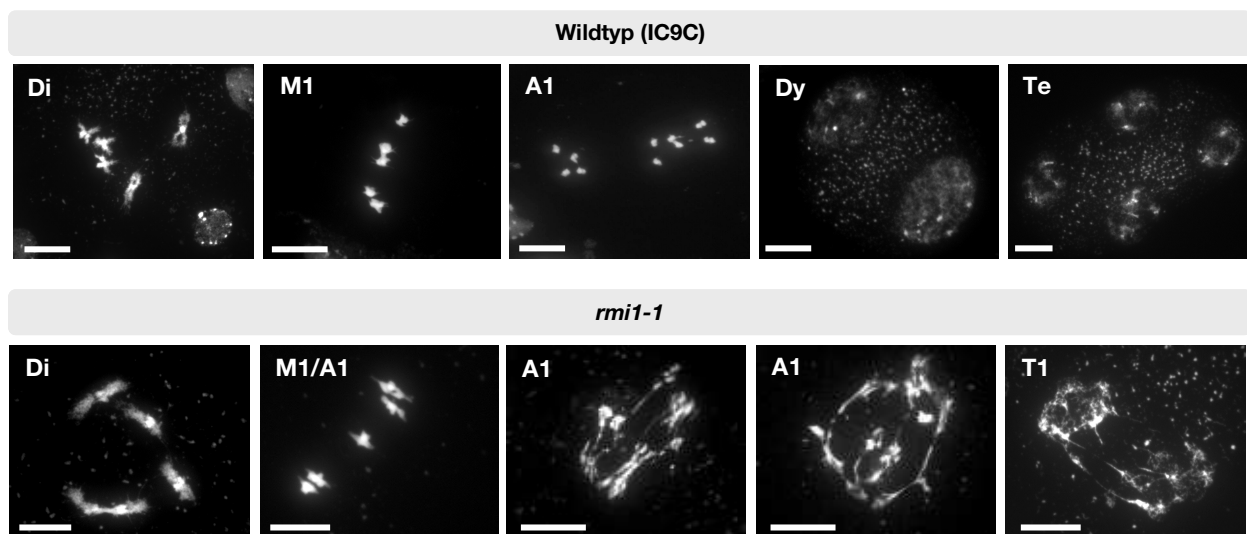


**Abb. 3.16: Auswirkung der fünf RMI1-Konstrukte auf die Fertilität des Wildtyps und der *rmi1-1* Mutante.** Zur Quantifizierung der Fertilität der *rmi1-1* Mutante nach der Transformation mit den Konstrukten RMI1, RMI1ΔDUF, RMI1ΔOB1 und RMI1ΔOB2 wurde die Samenzahl pro Schote der etablierten Linien ermittelt. Hierzu wurde die Samenzahl von fünf Schoten von jeweils fünf Pflanzen gemittelt und die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben. Zum Vergleich wurde ebenfalls die Samenzahl pro Schote der etablierten Wildtyp-Linien ermittelt. Im Vergleich zur Expression der rekombinanten RMI1-Varianten im Wildtyp kann eine Komplementation der *rmi1-1* Mutante nur mit den Konstrukten RMI1 und RMI1ΔOB2 erreicht werden. Die Samenzahlen der Linien *rmi1-1::RMI1ΔDUF* und *rmi1-1::RMI1ΔOB1* sind vergleichbar mit denen der untransformierten *Atrmi1-1* Mutante.

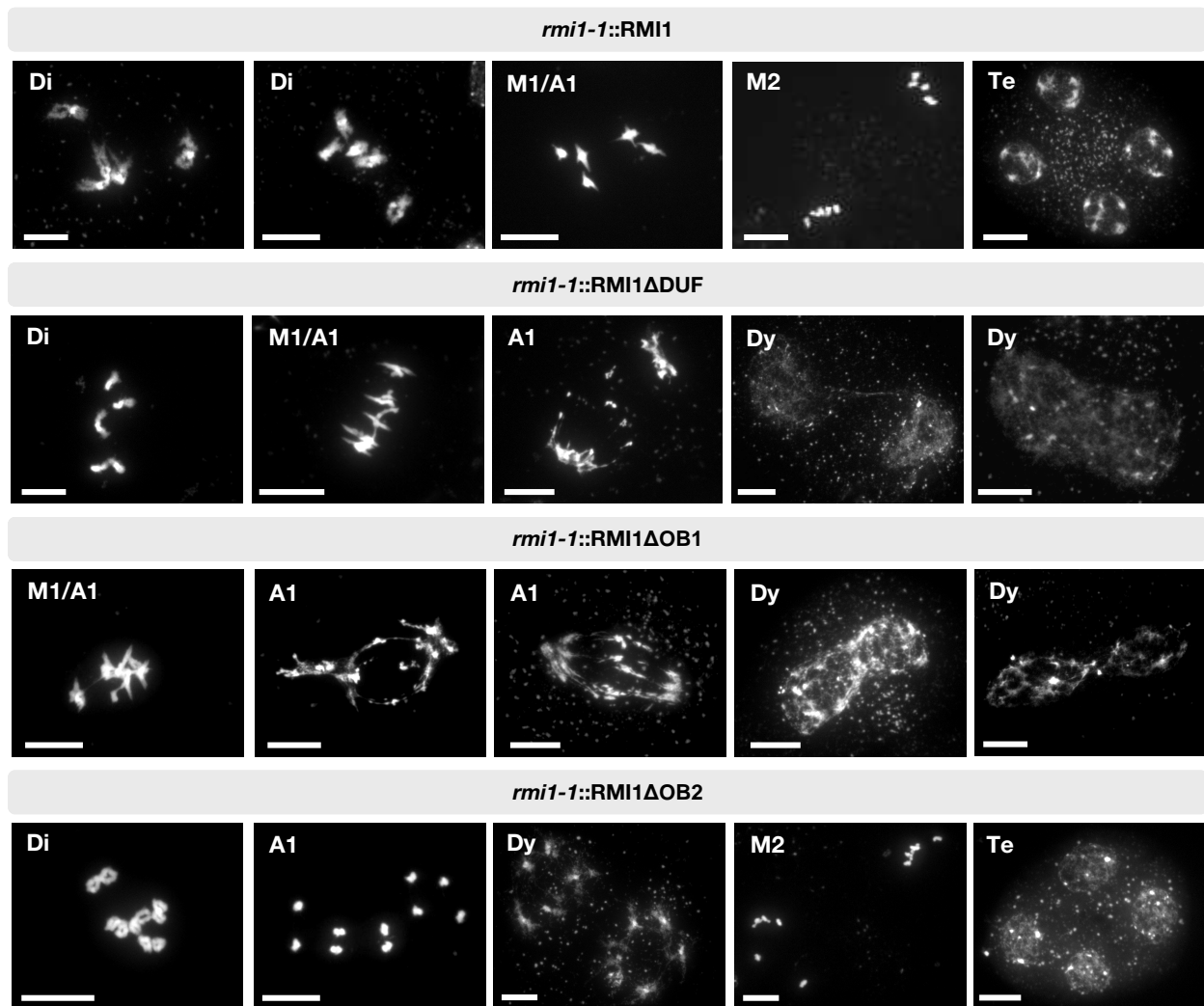


**Abb. 3.17: Schoten einer Wildtyppflanze (A), der sterilen Linie *rmi1-1::RMI1ΔOB1* (B) und der sterilen *Atrmi1-1* Mutante (C).** Im Vergleich zum Wildtyp (A) sind die Schoten der sterilen Linie *rmi1-1::RMI1ΔOB1* (B) und der sterilen *Atrmi1-1* Mutante (C) dargestellt. Die Schoten der sterilen Pflanzenlinien sind wesentlich kürzer (0,3 cm bis 0,5 cm) als die Schoten einer Wildtyppflanze (etwa 1,2 cm) und enthalten nicht keimfähige Samen. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 0,2 cm.

Durch die Expression des rekombinanten *RMI1 $\Delta$ DUF* und *RMI1 $\Delta$ OB1* konnte keine Aufhebung des meiotischen Defekts bewirkt werden. Die beschriebenen Auffälligkeiten der sterilen *Atrmi1* Mutanten (Chelysheva *et al.*, 2008; Hartung *et al.*, 2008), lassen sich ebenso nach der Transformation mit den beiden trunkierten RMI1-Konstrukten beobachten. Bereits in der Diakinese sind Chromatinbrücken zwischen nicht homologen Chromosomen vorhanden, die sich auch zwischen den stärker kondensierten Bivalenten in der Metaphase beobachten lassen. Es zeigt sich keine Veränderung in den etablierten Komplementationslinien *rmi1-1::RMI1 $\Delta$ DUF* und *rmi1-1::RMI1 $\Delta$ OB1* zur ursprünglichen Mutantenlinie *rmi1-1*. In der Anaphase I treten erneut starke Chromosomenfragmentierungen auf, während die homologen Chromosomen durch den Spindelapparat zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen werden sollen. Aufgrund der Chromatinfragmente im Bereich der Metaphasenplatte beziehungsweise weiterhin verbundener Chromosomenfragmente in den gegenüberliegenden Chromatinbereichen entstehen defekte Telophase I Stadien (T1) und defekte Dyaden (Dy) wie sie in Abbildung 3.19 dargestellt sind. Diese zeichnen sich durch einzelne Chromatinbrücken zwischen den polaren Chromatingruppen aus oder stellen weiterhin einen zusammenhängenden Chromatinbereich dar, der nur ansatzweise voneinander getrennt erscheint.



**Abb. 3.18: Meiosestadien des Wildtyp (IC9C) und der *Atrmi1-1* Mutante.** Dargestellt sind verschiedene Meiosestadien ab dem späten Diplotän (Di) aus Pollenmutterzellen des Wildtyp (IC9C) und der Mutante *Atrmi1-1*, um den meiotischen Defekt der *Atrmi1-1* Mutante deutlich zu machen (Chelysheva *et al.*, 2008; Hartung *et al.*, 2008). Das Chromatin der Zellen wurde zum Abschluss der Meiozytenpräparation mit DAPI gefärbt woraufhin der DNA/DAPI-Komplex mit dem Fluoreszenzmikroskops detektiert werden kann. In der Mutante *Atrmi1-1* verläuft die Prophase I bis zur Diakinese unauffällig, gezeigt sind die bereits kondensierten gepaarten homologen Chromosomen (Bivalente) in der Diakinese (Di). Zwischen den Bivalenten der *Atrmi1-1* Mutante sind Chromatinbrücken ausgebildet. Anschließend lagern sich die vollständig kondensierten Chromosomen während der Metaphase I (M1) an der Äquatorialebene an, um während der Anaphase I (A1) zu den entgegengesetzten Polen gezogen zu werden. Im Vergleich zum Wildtyp wird der meiotische Defekt der Mutant *Atrmi1-1* in der Anaphase I (A1) deutlich. Es treten starke Chromosomenfragmentierungen auf und die Meiose bricht in der *Atrmi1-1* Mutante zum Ende der ersten Reifeteilung ab. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m. Di: Diakinese; M1: Metaphase I; M1/A1: frühe Anaphase; A1: Anaphase I; T1: Telophase I; Dy: Dyade; Te: Tetrade.



**Abb. 3.19: Ausgewählte Meiosestadien aus der cytologischen Untersuchung der *Atrmi1-1*-Komplementationslinien.** Dargestellt sind unterschiedliche Meiosestadien der *rmi1-1* Komplementationslinien mit den Konstrukten RMI1, RMI1ΔDUF, RMI1ΔOB1 und RMI1ΔOB2. Durch die Expression der rekombinanten Proteine RMI1 und RMI1ΔOB2 kann der Fortgang der Meiose bewirkt werden. Es erfolgt eine Auftrennung der homologen Chromosomen ohne Chromosomenfragmentierungen und die Tetradenbildung zum Ende der Meiose II. Die Expression der Konstrukte RMI1ΔDUF und RMI1ΔOB1 kann den meiotischen Phänotyp der *Atrmi1-1* Mutante nicht aufheben. Bereits in der Metaphase I können vom Wildtyp abweichende Bivalent-Strukturen beobachtet werden und in der Anaphase I kommt es zu den *Atrmi1-1* typischen starken Chromosomenfragmentierungen. Ein Großteil des Chromatins verbleibt im Bereich der Metaphasenplatte, wodurch es zur Bildung nicht vollständig getrennter polarer Chromosomengruppen im Dyadenstadium kommt. Stadien der Meiose II konnten in den Komplementationslinien *rmi1-1xIC9C::RMI1ΔDUF* und *rmi1-1xIC9C::RMI1ΔOB1*, wie bereits von der *Atrmi1-1* Mutante bekannt, nicht identifiziert werden. Der angegebene Maßstabsbalken entspricht 10 μM. Di: Diakinese, M1: Metaphase I, A1: Anaphase I, Dy: Dyade, M2: Metaphase II, Te: Tetrade.

### 3.2 Untersuchungen zur HJ-Resolution durch verschiedene Resolvasen

Der Mechanismus der *Dissolution* ist, wie bereits in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, nicht die einzige Möglichkeit zur Auflösung von Rekombinationsintermediaten. Kommt es im Verlauf der Doppelstrangbruchreparatur zur Bildung einer dHJ, kann diese entweder durch die Aktivität

von spezifischen Endonukleasen (HJ-Resolvasen) über den *Resolution* Weg oder durch den RTR-Komplex über den *Dissolution* Mechanismus aufgelöst werden. Die Prozessierung der dHJ durch die RECQ-Helikase des RTR-Komplex führt zu einer sogenannten Hemikatenan-Struktur, die nur durch den RTR-Komplex zu NCO-Produkten aufgelöst werden kann. Wird durch die enzymatische Aktivität der RECQ-Helikase *branch migration* eingeleitet und das Hemikatenan gebildet, aber im Anschluss nicht durch die Topoisomerase 3/3 $\alpha$  und das Strukturprotein RMI1 aufgelöst, stellt es ein toxisches DNA-Rekombinationsintermediat dar. In den Mutanten *Attop3a* und *Atrmi1-1* führt das zur Sterilität, da die Meiose zum Ende der ersten Reifeteilung abbricht (Hartung *et al.*, 2007, 2008; Chelysheva *et al.*, 2008).

Die grundlegende Fragestellung zu diesem Projekt war, ob es möglich ist, durch die Überexpression verschiedener HJ-Resolvasen beziehungsweise putativer Resolvasen, die Auflösung der dHJ über den *Resolution* Mechanismus zu begünstigen, um so den sterilen Phänotyp der *Atrmi1-1* Mutante aufzuheben und die Anzahl an COs in der Meiose zu erhöhen, oder ob immer ein gewisser Anteil an dHJs über die *Dissolution* prozessiert wird.

Hierfür wurden der Endonukleasekomplex *AtMUS81/AtEME1A* und die putative HJ-Resolvase *AtGEN1* aus *A. thaliana* sowie zur heterologen Expression der bakterielle Resolvasekomplex *EcRuvABC*, die Resolvase *EcRusA* und der Endonukleasekomplex *ScSlx1/ScSlx4* aus Hefe ausgewählt.

### 3.2.1 Experimenteller Ansatz zur Expression verschiedener Resolvasen in *Atrmi1*

Für eine meiosespezifische Expression der ausgewählten Resolvasen beziehungsweise putativer Resolvasen wurden zwei unterschiedliche Promotoren gewählt. Zum einen der Promotor von *AtDMC1*, dessen Expression während der Meiose bereits nachgewiesen wurde (Klimyuk und Jones, 1997) und zum anderen der Promotor von *AtRMI2* (At1g08390). Dieser wurde anhand der Microarray-Daten ausgewählt, die 2005 veröffentlicht wurden (Schmid *et al.*, 2005). *AtRMI2* zeigt zwar kein meiosespezifisches Expressionsmuster, aber neben der somatischen Expression eine starke Expression in den Blütenständen. Da *RMI2* als Komplexpartner des mammalischen RTR-Komplex nachgewiesen wurde (Singh *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2008), sollte der *AtRMI2*-Promotor eine Expression in einem Zeitfenster ermöglichen, das dem Zeitfenster sehr nahe kommt, in dem der RTR-Komplex aktiv ist. Im Gegensatz zur Rekombinase *AtDMC1*, die gleich zu Beginn der meiotischen HR an der Stranginvasion beteiligt ist (Couteau *et al.*, 1999), ist der RTR-Komplex zu einem späteren Zeitpunkt an der Auflösung der dHJ beteiligt.

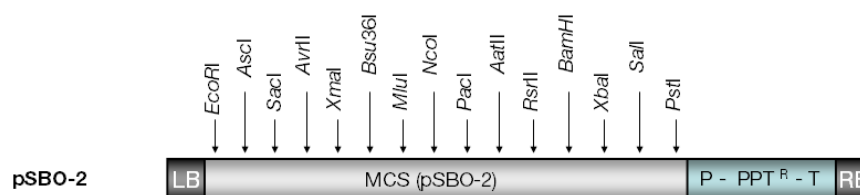
Die Klonierungen dieses Projekts basieren ebenfalls auf dem Vektor pSBO-2 mit einem *BAR-ORF* (vgl. Abschnitt 2.6 und Abbildung 3.20), der bereits für die *RMI1*-Komplementationskonstrukte genutzt wurde.

Für die insgesamt zehn Konstrukte wurden zu Beginn zwei Grundvektoren mit einem oder zwei *DMC1*-Promotoren erstellt (vgl. Abbildung 3.21). Hierzu wurde die Sequenz des

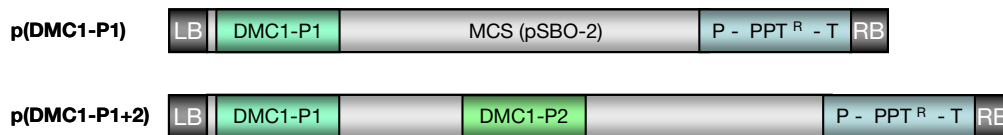
*DMC1*-Promotorbereichs (1082 bp) aus dem Vektor pSBO-17 (Bonnet, 2009) amplifiziert und in einer weiteren PCR-Reaktion mit den invers orientierten Sequenzen der Restriktionschnittstellen der *Homing* Endonukleasen I-SceI oder Pi-PspI flankiert (vgl. Tabelle 6.3). Diese sollten den späteren Austausch gegen den *RMI2*-Promotor (999 bp) unabhängig von den bereits eingefügten Sequenzen ermöglichen. Das DNA-Fragment des *RMI2*-Promotors wurde aus genomischer DNA von *A. thaliana* amplifiziert, die flankierenden Sequenzen der invers orientierten Schnittstellen wurden ebenfalls in einer zweiten PCR-Reaktion mit Überhangprimern angefügt. Beide *DMC1*-Promotoren wurden in die Schnittstellen *AscI/Bsu36I* (*DMC1*-P1) beziehungsweise *AatII* (*DMC1*-P2) der *MCS* von pSBO-2 kloniert (vgl. Abbildung 3.20).

Es wurden zuerst die Konstrukte p(*DMC1*-P)-GEN1, p(*DMC1*-P)-MUS81/EME1A, p(*DMC1*-P)-ScSlx1/ScSlx4, p(*DMC1*-P)-EcRusA und p(*DMC1*-P)-EcRuvABC kloniert. Anschließend sollten die *DMC1*-Promotoren mit Hilfe der Schnittstellen I-SceI oder Pi-PspI gegen die *RMI2*-Promotoren getauscht werden. Als Terminator wurde der 35S Terminator des Blumenkohl-Mosaik-Virus verwendet, welcher für die Homologie-basierte In-Fusion® Klonierung für jedes Konstrukt mit den benötigten Homologien zum entsprechenden Gen beziehungsweise zum Vektor versehen wurde. Sämtliche Klonierungsschritte zum Einfügen der jeweiligen Gene mit 35S Terminator (202 bp) wurden mit Hilfe des In-Fusion® Klonierungssystem durchgeführt. Dementsprechend wurde jedes amplifizierte DNA-Fragment in einer zweiten PCR-Reaktion mit den benötigten Homologien versehen. Die Sequenzen der verwendeten Überhangprimer sind der Tabelle 6.3 im Anhang zu entnehmen.

Der T-DNA-Bereich der zehn klonierten Plasmide wurde vollständig sequenziert, um diese auf mögliche Sequenzveränderungen zu prüfen. Es wurden nur Plasmide zur Agrobakterien-vermittelten Transformation eingesetzt, die keine Veränderungen der T-DNA-Sequenz aufwiesen.



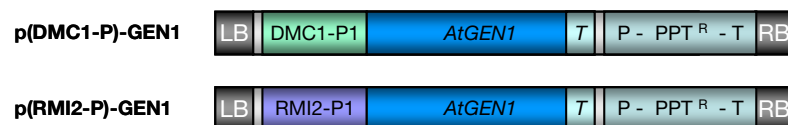
**3.20: Multiple cloning site (MCS) des Vektors pSBO-2.** Dargestellt ist das Schema des Ausgangsvektor pSBO-2 mit der Abfolge der Restriktionschnittstellen der *MCS*. LB: *left border*, RB: *right border*, P-PPT<sup>R</sup>-T: PPT-Resistenz-Kassette.



**Abb. 3.21: T-DNA-Bereich der Grundvektoren zur Klonierung der Resolvasen-Konstrukte.** Dargestellt ist das Schema der beiden Grundvektoren p(DMC1-P1) und p(DMC1-P1+2), die auf dem Vektor pSBO-2 mit einer PPT-Resistenz-Kassette (P-PPT<sup>R</sup>-T) basieren. Der DMC1-P1 Promotor (DMC1-P1) wird durch die Sequenz der Restriktionsschnittstelle I-SceI flankiert und wurde über die Schnittstellen *AscI/Bsu36I* in die MCS des Vektors pSBO-2 eingefügt. In einem weiteren Klonierungsschritt wurde der zweite DMC1-Promotor (DMC1-P2) für die Expression des heterodimeren Endonukleasekomplex *AtMUS81/AtEME1A* beziehungsweise *ScSIX1/ScSIX4* eingebracht. Der DMC1-P2 wird beidseitig durch die Restriktionsschnittstelle von *Pi-PspI* flankiert und wurde über die Schnittstellen *AatII* eingefügt. LB: left border, RB: right border.

### 3.2.1.1 Expressionskonstrukte *AtGEN1*

Die 1713 bp lange cDNA-Sequenz von *AtGEN1* wurde anhand des Vektors pETDuet1-StrepII PS-*AtGEN1* (M. Bauknecht, unveröffentlicht) amplifiziert und nach dem Anfügen der erforderlichen Homologien mit dem Terminator über die Restriktionsschnittstelle *MluI* in den Vektor p(DMC1-P1) eingebracht (vgl. Abbildung 3.22). Der Austausch des DMC1-Promotors gegen den RMI2-Promotor erfolgte mit Hilfe der *I-SceI*-Schnittstellen beidseitig des Promotors. Aufgrund der inversen Orientierung der Sequenzen, war die Orientierung des Promotors vorgegeben.

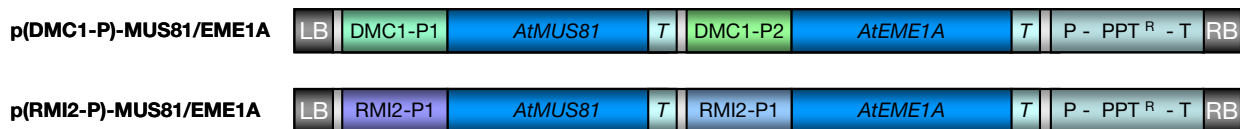


**Abb. 3.22: Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-GEN1 und p(RMI2-P)-GEN1.** Dargestellt ist das Schema der beiden Konstrukte zur Expression von *AtGEN1*. Die codierende Sequenz von *AtGEN1* (1713 bp) steht unter der Kontrolle des meiotischen *DMC1*-Promotor (DMC1-P1) beziehungsweise des meiotischen Promotors RMI2-P (RMI2-P1) und dem 35S Terminator (T). Der Austausch des *DMC1*-Promotors gegen den RMI2-Promotor erfolgte anhand der flankierenden Restriktionsschnittstellen von *I-SceI*. Zur Selektion in Pflanzen enthalten beide Konstrukt einen *BAR-ORF* (P-PPT<sup>R</sup>-T).

### 3.2.1.2 Expressionskonstrukte des Endonukleasekomplexes *AtMUS81/AtEME1A*

Zur Amplifikation von *AtMUS81* (1980 bp) und *AtEME1A* (1641 bp) diente der Vektor pSBO-17 (Bonnet, 2009) als Matrize. Über die Homologie-basierte In-Fusion<sup>®</sup> Reaktion wurden die codierenden Sequenzen von *AtMUS81* und *AtEME1A* mit jeweils einem 35S-Terminator über die Schnittstellen *Bsu36I/NcoI* beziehungsweise *AvrII/RsrII* in den linearisierten Vektor p(DMC1-P1) eingebracht (vgl. Abbildung 3.23). Die Verwendung der *AvrII* Schnittstelle für das Einbringen von *AtEME1A* war möglich, da diese Schnittstelle zuvor mit dem zweiten DMC1-Promotor eingebracht wurde und die ursprüngliche *AvrII* Schnittstelle der pSBO-2 MCS durch

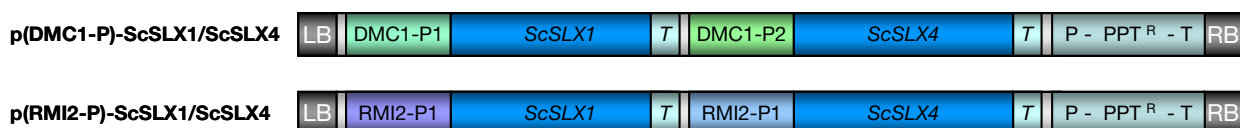
das Einklonieren des ersten DMC1-Promotors verloren ging. Der Austausch des ersten DMC1-Promotors gegen den RMI2-Promotor erfolgte über die flankierende *I*-SceI Schnittstelle. Der zweite DMC1-Promotor wurde mit beidseitig mit der Restriktionsschnittstelle von *Pi*-PspI versehen. Da der Restriktionsverdau des Vektors nicht vollständig gelang, wurde der zweite RMI2-Promotor über die ebenfalls beidseitig vorliegende *Aat*II-Schnittstelle eingefügt.



**Abb. 3.23: Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-MUS81/EME1A und p(RMI2-P)-MUS81/EME1A.** Dargestellt ist das Schema der beiden Konstrukte zur Expression des Endonukleasekomplexes *AtMUS81/AtEME1A*. Die codierenden Sequenzen von *AtMUS81* (1980 bp) und *AtEME1A* (1641 bp) stehen unter der Kontrolle des meiotischen DMC1-Promotors (DMC1-P1) beziehungsweise des ebenfalls meiotischen Promotors RMI2-P (RMI2-P1) und dem 35S Terminator (T). Zur Selektion in Pflanzen enthält das Konstrukt einen *BAR-ORF* (P-PPT<sup>R</sup>-T).

### 3.2.1.3 Expressionskonstrukte des Endonukleasekomplexes *ScSlx1/ScSlx4*

Für die Amplifikation von *ScSLX1* (915 bp) und *ScSLX4* (2247 bp) wurde genomische DNA des Hefestamms AH 109 als Matrize eingesetzt. In einer zweiten PCR Reaktion wurden die Homologien zum Promotor beziehungsweise zum Terminator über Primer mit Adaptersequenz angefügt. *ScSLX1* und *ScSLX4* wurden jeweils mit dem entsprechenden Terminator und dem linearisierten Vektor über die auf homologen Sequenzen basierende In-Fusion<sup>®</sup> Reaktion miteinander rekombiniert (vgl. Abbildung 3.24). Der Vektor wurde für diese Reaktion zuerst mit den Restriktionsenzymen *Bsu*36I/*Nco*I für das Einfügen des *ScSLX1*-Fragments und Terminator und für die zweite Reaktion mit *Avr*II/*Rsr*II (*ScSLX4* und Terminator) in einem Doppelverdau linearisiert. Auch hier konnte die zusätzlich eingebrachte *Avr*II-Schnittstelle genutzt werden, da die ursprüngliche *Avr*II Schnittstelle mit dem Einfügen des DMC1-P1 Fragments verloren ging. Der Austausch der beiden DMC1-Promotoren gegen RMI2-Promotoren verlief über die beidseitig gelegenen *I*-SceI (*ScSLX1* und Terminator) beziehungsweise *Aat*II (*ScSLX4* und Terminator) Schnittstellen.

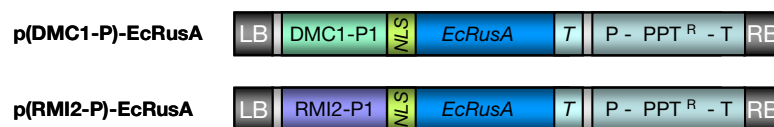


**Abb. 3.24: Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-ScSLX1/ScSLX4 und p(RMI2-P)-ScSLX1/ScSLX4.** Dargestellt ist das Schema der beiden Konstrukte zur Expression des Endonukleasekomplexes *ScSlx1/ScSlx4*. Die codierenden Sequenzen von *ScSLX1* (915 bp) und *ScSLX4* (2247 bp) stehen unter der Kontrolle der meiotischen Promotoren DMC1-P1 und RMI2-P (RMI2-P1) und dem 35S Terminator (T). Um eine spätere Selektion der konstruktrtragenden Pflanzen zu ermöglichen, ist ein *BAR-ORF* (P-PPT<sup>R</sup>-T) vorhanden.



### 3.2.1.4 Expressionskonstrukte *EcRusA*

Um den Transport des bakteriellen Protein *EcRusA* (363 bp) in den Kern zu ermöglichen, wurden dessen genomische DNA-Sequenz mit einem 5'-Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, *NLS*) versehen. Die Sequenzinformation zur *NLS* stammt aus der Sequenz des Vektors pEN-L1-NFI-L2 (Grebenok *et al.*, 1997; Karimi *et al.*, 2007) und wurde als Oligonukleotid mit homologen Überhängen über die Firma biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert. Über eine Overlap-Extension PCR Reaktion wurden die DNA-Fragmente der *NLS*, *EcRusA* und des 35S-Terminators zusammengefügt und das entstandene Fragment über die Schnittstelle *Bsu36I/NcoI* in den Vektor p(DMC1-P1) kloniert (vgl. Abbildung 3.21, 3.25). Anschließend wurde der DMC1-Promotor über die beidseitig vorliegenden *I-SceI* Restriktionsschnittstellen durch den RMI2-Promotor ausgetauscht.



**Abb. 3.25: Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-*EcRusA* und p(RMI2-P)-*EcRusA*.** Dargestellt ist das Schema der beiden Konstrukte zur Expression des bakteriellen *EcRusA* (363 bp) unter Kontrolle der meiotisch aktiven Promotoren DMC1-P1 oder RMI2-P1. An das *EcRusA*-Fragment wurde über eine Overlap-Extension PCR eine Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization signal*, *NLS*) angefügt, um den Transport des Proteins in den Kern zu ermöglichen. Zur Selektion in Pflanzen enthält das Konstrukt einen *BAR-ORF* (P-PPT<sup>R</sup>-T).

### 3.2.1.4 Expressionskonstrukte des bakteriellen Resolvasekomplexes *EcRuvABC*

Die Gene *RuvA*, *RuvB* und *RuvC* wurden unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors exprimiert, um mögliche *Silencing*-Effekte durch mehrere gleiche Promotoren zu vermeiden (Daxinger *et al.*, 2008). Um trotzdem die Bildung von drei unabhängigen Proteinen zu ermöglichen, wurden die Gene *EcRuvA*, *EcRuvB* und *EcRuvC* als ein ORF mit jeweils der Sequenz des T2A-Peptid (Toyoda *et al.*, 1986, Sommergruber *et al.*, 1989, Ryan und Flint, 1997) nach *EcRuvA* und *EcRuvB* kloniert. Die in dieser Arbeit verwendete T2A-Sequenz mit der Aminosäuresequenz EGRGSLTTCGDVEENPGP stammt aus dem *Thosea asigna* Virus (TaV) aus der Familie der Tetraviridae (Pringle *et al.*, 1999). Der Einsatz von T2A-Sequenzen aus verschiedenen Virus-Spezies ermöglicht die Expression von Polyproteinensequenzen, deren Trennung während der Translation durch den ribosomalen *skipping* Mechanismus oder *StopGo* Mechanismus beschrieben wird (Atkins *et al.*, 2007, Luke *et al.*, 2009). Diese beruhen darauf, dass die Peptidbindung zwischen den konservierten Aminosäuren Glycin am C-Terminus der 2A-Sequenz und dem darauffolgenden Prolin (N-terminale Aminosäure des 2B Proteins) nicht zustande kommt. Die *releasing* Faktoren (RFs) eRF1 und eRF3 erkennen das Prolin an der A-Stelle des Ribosoms als Terminationssignal, bewirken die Hydrolyse der Glycin-tRNA-



Esterbindung und die Freisetzung des Proteins. Die Dissoziation der RFs ermöglicht die Anlagerung der Prolyl-tRNA an die A-Stelle des Ribosoms. Die Translokation der Prolyl-tRNA von der A- zur P-Stelle des Ribosoms initiiert die Translation des folgenden Proteins (Doronina *et al.*, 2008a, 2008b, Luke *et al.*, 2009). Die Möglichkeit dieses Mechanismus mehrere Gene in einem ORF unter der Kontrolle eines Promotors zu exprimieren wurde bereits erfolgreich in *A. thaliana* angewendet (Halpin *et al.*, 1999, François *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010).

Für die Klonierung des Plasmids p(DMC1-P1)-EcRuvABC wurden ebenfalls Oligonukleotide mit der benötigten NLS-Sequenz beziehungsweise der NLS- und T2A-Sequenz über die Firma biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert. Jedes Oligonukleotid wurde mit der entsprechenden homologen Sequenz flankiert. Da es nicht möglich war insgesamt sieben DNA Fragment über eine In-Fusion® Reaktion in den Vektor p(DMC1-P1) einzufügen, wurden die folgenden Fragmente zuerst über Overlap-Extension PCR miteinander verbunden: NLS (mit Homologie zu RuvA) und RuvA; T2A-NLS (mit Homologie zu RuvB) und RuvB; RuvC und Terminator (mit Homologie zu RuvC). Im Anschluss wurden in einer weiteren Overlap-Extension PCR die zwei Fragmente T2A-NLS (mit Homologie zu RuvC) und RuvC-Terminator miteinander verbunden. Diese drei Fragmente konnten nun über das In-Fusion® Klonierungssystem in den linearisierten Vektor p(DMC1-P1) (*Bsu36I/NcoI*) eingebracht werden (vgl. Abbildung 3.26). Auch bei diesem Konstrukt erfolgte nach Abschluss der ersten Klonierung, der Austausch des DMC1-P1 durch den Promotor RMI2-P1 über die Restriktionsschnittstellen von *I-SceI* beidseitig der Promotoren.



**Abb. 3.26: Schematische Darstellung der Konstrukte p(DMC1-P)-EcRuvABC und p(RMI2-P)-EcRuvABC.** Die Amplifikation der einzelnen Gene erfolgte mit Hilfe genomischer DNA als Matrize (*EcRuvA*: 612 bp, *EcRuvB*: 1011 bp, *EcRuvC*: 522 bp) Die Regulation der Expression des gesamten ORF erfolgte durch die meiotischen Promotoren DMC1-P1 oder RMI2-P1. Durch die Verwendung der Sequenz des T2A-Peptids zwischen *EcRuvA*/*EcRuvB* und *EcRuvB*/*EcRuvC* entstehen während der Translation einzelne eigenständigen Proteine. Um den Transport in den Kern zu ermöglichen, wurde ein 5'-Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal, NLS*) an jedes der Gene gekoppelt. Zur Selektion transformierter Pflanzen enthält das Konstrukt einen *BAR-ORF* (P-PPT<sup>R</sup>-T).

### 3.2.2 Auswirkungen der Resolvase-Konstrukte auf die *Atrmi1-1* Mutanten

Um die Auswirkungen der Expression der einzelnen Konstrukte zu untersuchen, wurde jedes der klonierten Plasmide in den Wildtyp (IC9C) und die Mutanten *rmi1-1* IC9C und *rmi1-2* IC9C über Agrobakterien-vermittelte Transformation eingebracht (vgl. Abschnitt 2.13.3) und transgene Linien etabliert (vgl. Abschnitt 2.14.5). Um einen Überblick zu erhalten, welches der

Konstrukte in der Lage ist, die Phänotypen der *Atrmi1*-Mutanten zu beeinflussen, wurde zuerst die Auswirkung der Expression auf die Sterilität der *Atrmi1-1* Mutante untersucht.

Anhand der T-DNA-vermittelten PPT-Resistenz wurden die positiven Primärtransformanden der T1-Generation selektioniert und anschließend bezüglich der Deletion der *Atrmi1-1* Mutante genotypisiert (vgl. Abschnitt 2.12.6, Abbildung 2.3). Diese Pflanzen wurden zur weiteren Anzucht in Erde pikiert und bis zur Schotenbildung beziehungsweise Samenreife im Gewächshaus angezogen. Nach etwa fünf bis sechs Wochen konnten die Pflanzen in Bezug auf ihre Fertilität untersucht werden. Für die Expression von *AtGEN1*, *AtMUS81/AtEME1A*, *ScSLX1/ScSLX4*, *EcRusA* und *EcRuvABC* sowohl unter Kontrolle des DMC1-Promotors als auch des RMI2-Promotor konnten keine fertilen homozygoten *Atrmi1-1* Mutanten identifiziert werden. In der Tabelle 3.2 sind genauere Angaben zur Anzahl der genotypisierten Pflanzen und der identifizierten homozygoten *Atrmi1-1* Mutanten aufgeführt.

**Tabelle 3.2: Übersicht der genotypisierten *Atrmi1-1*-Expressionslinien.** Angegeben sind die Zahlen der selektionierten positiven Primärtransformanden der T1 Generation (*Atrmi1-1* segregierend) und die entsprechende Anzahl an homozygoten *Atrmi1-1* Mutanten, die auf ihre Fertilität untersucht wurden. In keiner der transformierten Linien konnte durch die Expression der Resolvase-Konstrukte eine Auswirkung auf die Sterilität der *Atrmi1-1* Mutante festgestellt werden. T1: positive Primärtransformanden der T1-Generation, *Atrmi1-1* -/-: homozygote *Atrmi1-1* Mutanten.

Linie	T1	<i>Atrmi1-1</i> -/-	davon fertil [%]
<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-GEN1	86	19	0%
<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-GEN1	83	18	0%
<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-MUS81/EME1A	97	23	0%
<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-MUS81/EME1A	63	13	0%
<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-ScSLX1/ScSLX4	172	41	0%
<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-ScSLX1/ScSLX4	174	43	0%
<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-EcRusA	152	37	0%
<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-EcRusA	171	41	0%
<i>rmi1-1</i> IC9C::(DMC1-P)-EcRuvABC	160	37	0%
<i>rmi1-1</i> IC9C::(RMI2-P)-EcRuvABC	133	30	0%

### 3.3 Generierung von Doppelmutanten mit *Atrmi1*

Um die Funktion von *AtRMI1* in der Reparatur von DNA-Schäden in Bezug auf die Rolle anderer Reparaturfaktoren zu untersuchen, sollten in dieser Arbeit Doppelmutanten durch Kreuzungen generiert werden. Durch die Kombination zweier defekter Proteine können anhand des entstehenden Phänotyps, beispielsweise Aussagen über die zeitliche Abfolge ihrer Funktionen im Verlauf der Reparatur von DNA-Schäden getroffen werden. Es ist ebenfalls möglich, die proteinspezifischen Aufgaben verschiedenen DNA-

Reparaturmechanismen zuzuordnen. Um eine spätere Untersuchung der somatischen HR zu ermöglichen, wurden sämtliche Kreuzungen im IC9C-Hintergrund durchgeführt.

### 3.3.1 Die Doppelmutante *Atrmi1-2 mus81-1* IC9C

Für den heterodimeren Endonukleasekomplex MUS81/EME1 (Mus81/Mms4 in *S.c.*) konnten in verschiedenen Organismen bereits eine Beteiligung Reparatur blockierter und kollabierter Replikationsgabeln und an der Prozessierung von Rekombinations-intermediaten der HR gezeigt werden. Auch in *A. thaliana* ist für die Komplexe *AtMUS81/AtEME1A* und *AtMUS81/AtEME1B* eine endonukleolytische Aktivität zur Umsetzung von 3'-Flaps, genickten HJs und auch intakten HJs nachgewiesen worden (Geuting *et al.*, 2009).

Da die Mutation der Endonuklease *AtMUS81* und der RecQ-Helikase *AtRECQ4A* oder deren Homologe in Hefe zur synthetischen Letalität führen, wird angenommen dass diese Proteine an parallelen Mechanismen zur Prozessierung replikationsassoziiierter aberranter DNA-Strukturen oder von Rekombinationsintermediaten beteiligt sind (Boddy *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2001; Hartung *et al.*, 2006; Mannuss *et al.*, 2010). Da sowohl *AtRECQ4A* als auch *AtRMI1* Bestandteil des RTR-Komplexes sind und für die Prozessierung von Rekombinationsintermediaten benötigt werden stellt sich die Frage, ob auch die Mutation von *AtRMI1* und *AtMUS81* zu einem ähnlichen Phänotyp führt wie der der Doppelmutante *Atmus81 recq4A*.

Es erfolgte die Kreuzung der beiden fertilen homozygoten Mutanten *Atrmi1-2* IC9C und *Atmus81-1* IC9C. In der F1-Generation wurden durch Genotypisierung (vgl. Abschnitt 2.12.6) Pflanzen ausgewählt und vermehrt, welche sowohl die Mutation von *Atrmi1-2*, als auch die von *Atmus81-1* hemizygot trugen. Die F2-Generation sollte mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:16 auch doppelt homozygote Mutanten enthalten, da aber in der F2-Generation keine doppelt homozygote *Atrmi1-2 mus81-1* IC9C Pflanzen ausfindig gemacht werden konnte, wurden Pflanzen vermehrt, die *Atmus81* Mutation hemizygot enthielten. Die F3-Generation sollte nach Mendel zu 1/4 doppelt homozygote Mutanten enthalten, aber es konnte keiner Pflanze der Genotyp *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>-/-</sup>* IC9C zugeordnet werden. Die Kreuzung der beiden homozygoten Mutanten *Atrmi1-2* IC9C und *Atmus81-1* IC9C führte nicht zur doppelt homozygoten Mutantenlinie *Atrmi1-2 mus81-1* IC9C.

Nach der Genotypisierung von 160 Pflanzen der F3 Generation der *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>+/-</sup>* IC9C Linie konnten keine Pflanzen identifiziert werden, die beide Mutationen homozygot enthielten. Da die Mutation von *Atmus81* und *Atrecq4A* zur Letalität der Pflanzen führt, wurde darauf geachtet ob bei der Anzucht der Pflanzen beispielsweise Keimlinge sehr früh absterben oder ob vermehrt nicht keimfähige Samen vorkommen. Allerdings konnte bei der sterilen Anzucht der Pflanzen auf GM-Platten weder tote Keimlinge noch eine entsprechende Menge an nicht keimfähigen Samen identifiziert werden. Die selben Beobachtungen konnten ebenfalls für die Doppelmutante *Atrmi1-1 mus81* IC9C gemacht werden. Auch hier war es nicht möglich, doppelt homozygote Pflanzen zu generieren (F. Hartung, persönliche Mitteilung). Bei der

Untersuchung der Schoten von *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>+/-</sup>* IC9C wurden mehrfach leere Samenanlagen beziehungsweise auch ein geringer Anteil an nicht keimfähigen Samen detektiert. Die beiden Mutanten *Atrmi1-2* und *Atmus81* zeigen somatische Defekte in Bezug auf DNA Reparatur und Rekombination und sind in ihrer Fertilität leicht eingeschränkt, nun führt die Kombination der beiden homozygoten Mutationen zu deutlichen Defekten in der Samenbildung.

Um diesen Phänotyp genauer in Bezug auf die Funktion von RMI1 zu betrachten wurde versucht die *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>+/-</sup>* IC9C Mutante mit den RMI1-Varianten RMI1, RMI1ΔDUF, RMI1ΔOB1 und RMI1ΔOB2 zu komplementieren. Dies sollte weitere Erkenntnis über die Funktion der einzelnen Domänen bringen.

Für die Komplementation wurde die Mutante *rmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>+/-</sup>* IC9C mit jeweils einer der etablierten Linien *rmi1-2* IC9C::RMI1, *rmi1-2* IC9C::RMI1ΔDUF, *rmi1-2* IC9C::RMI1ΔOB1 und *rmi1-2* IC9C::RMI1ΔOB2 (vgl. Tabelle 2.5; Abschnitt 3.1.1) gekreuzt. Die F1-Generation der Kreuzungen wurde anhand der PPT-Resistenz des RMI1-Konstruktes auf das Vorhandensein des jeweiligen Komplementationonstruktes überprüft. Zusätzlich wurden durch Genotypisierung Pflanzen ausgewählt, welche die Mutation im *AtMUS81* Locus hemizygot enthielten. In der F2-Generation wurde ebenfalls über die PPT-Resistenz eine Linie ausgewählt, welche das Konstrukt homozygot trug. Anschließend erfolgte die Überprüfung des Genotyps bezüglich des *AtMUS81* Locus.

Durch das Einkreuzen des funktionellen rekombinanten *RMI1* Gens konnte eine doppelt homozygote Linie *rmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>-/-</sup>* IC9C generiert werden. Die Homozygotie wurde in der F3-Generation erneut überprüft und ebenso die Mutation von *Atrmi1-2* und das Vorhandensein des Konstrukts. Der Genotyp *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>-/-</sup>* IC9C::RMI1 konnte bestätigt werden. Die Expression der rekombinanten Proteine RMI1ΔDUF, RMI1ΔOB1 und RMI1ΔOB2 führten zu keiner Veränderung. Es war weiterhin nicht möglich eine doppelt homozygote Mutante *rmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>-/-</sup>* IC9C zu generieren.

Zusätzlich sollte im Zusammenhang mit der *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>+/-</sup>* IC9C Mutante die Funktion der Resolvase-Konstrukte (vgl. Tabelle 2.3; Abschnitt 3.2) überprüft werden. Da sowohl der RMI2-Promotor als auch der DMC1-Promotor ebenfalls in somatischen Geweben aktiv sind, sollte eine Komplementation von somatisch bedingten Defekten auch möglich sein. Zu diesem Zeitpunkt lagen allerdings noch nicht zu allen Konstrukten etablierte Linien vor, daher wurde nur ein Teil der Konstrukte über Kreuzung eingebracht. Die restlichen Konstrukte wurden transformiert.

Die etablierten Linien folgender Konstrukte wurden in die *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>+/-</sup>* IC9C Mutante eingekreuzt: *rmi1-2* IC9C::(DMC1-P)-MUS81/EME1A, *rmi1-2* IC9C::(DMC1-P)-GEN1 und *rmi1-2* IC9C::(RMI2-P)-GEN1. Die F1-Generation dieser Kreuzungen wurde anhand der PPT-Resistenz auf das Vorhandensein des Konstruktes überprüft und auf die hemizygot vorliegende Mutation von *Atmus81-1* genotypisiert. Auch in der F2-Generation wurde die PPT-Resistenz

genutzt um Linien mit homozygot vorliegendem Resolvase-Konstrukt zu ermitteln. Durch Genotypisierung wurden die Pflanzen bezüglich der Mutation von *AtMUS81* überprüft.

Mit der zusätzlichen Expression von *AtGEN1* oder *AtMUS81/AtEME1A* konnte keine Aufhebung des *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>+/-</sup>* IC9C Defektes in der Samenbildung bewirkt werden. Durch die Genotypisierung von jeweils 40 Pflanzen der Linien *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>+/-</sup>* IC9C, mit den Konstrukten (DMC1-P)-*MUS81/EME1A*, (DMC1-P)-*GEN1* und (RMI2-P)-*GEN1* konnte keine doppelt homozygote Mutante in Bezug auf die Mutationen von *AtRMI1* und *AtMUS81* ermittelt werden.

Die Konstrukte zur Expression des Endonukleasekomplexes *ScSlx1/ScSlx4*, der Resolvase *EcRusA* und des Resolvasekomplexes *EcRuvABC* wurden über Agrobakterien-vermittelte Transformation in die Doppelmutante *Atrmi1-2<sup>-/-</sup> mus81-1<sup>+/-</sup>* IC9C eingebracht. Das Saatgut der Transformationen mit den Konstrukten p(DMC1-P)-*ScSLX1/ScSLX4*, p(RMI2-P)-*ScSLX1/ScSLX4*, p(DMC1-P)-*EcRusA*, p(RMI2-P)-*EcRusA*, p(DMC1-P)-*EcRuvABC* und p(RMI2-P)-*EcRuvABC* wurde vollständig zur Selektion der Primärtransformanten auf Selektionsmedium (PPT) ausgebracht. Aufgrund einer geringen Transformationseffizienz (0,3%) konnten nur zwischen 10 und 20 Primärtransformanten selektioniert werden. Diese Pflanzen der T1-Generation wurden ebenfalls durch PCR-basierte Genotypisierung auf das Vorhandensein der *mus81-1* T-DNA-Insertion überprüft. Aber keines der Konstrukte führte zur Bildung des doppelt homozygoten Genotyps *Atrmi1-2 mus81-1* IC9C und somit zur Aufhebung des somatischen Defekts in der Samenbildung.

## 4 Diskussion

Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgt in Prokaryoten und einzelligen Eukaryoten meist durch den Mechanismus der homologen Rekombination. In multizellulären Eukaryoten dagegen ist das *NHEJ* der vorherrschende Weg zur Reparatur von DSBs, führt allerdings vermehrt zu Deletionen oder Insertionen. Nur in den seltensten Fällen kann ein DSB direkt ligiert werden. Die Mechanismen der homologen Rekombination hingegen ermöglichen durch die Verwendung einer homologen Sequenz, beispielsweise aus dem Schwesterchromatid oder dem homologen Chromosom, die Integrität und Stabilität des Genoms zu erhalten.

Der evolutionär stark konservierte RTR-Komplex, bestehend aus einer RECQ-Helikase, einer Topoisomerase 3/3 $\alpha$  und dem Strukturprotein RMI1, ist maßgeblich beteiligt an einem Weg der homologen Rekombinations-Reparatur, der *Dissolution*. Der RTR-Komplex katalysiert die Prozessierung von somatischen und auch meiotischen Rekombinationsintermediaten von der dHJ über eine Hemikatenan-Struktur zum NCO-Produkt. Durch die Auflösung von Rekombinationsintermediaten und der Suppression von CO-Produkten trägt der RTR-Komplex maßgeblich zum Erhalt der Genomstabilität bei. Im Zusammenhang mit der Funktion des RTR-Komplex spielt auch das Strukturprotein RMI1 eine essentielle Rolle, wie durch die bisherige Charakterisierung von RMI1-Mutante in verschiedenen Organismen bestätigt werden konnte. Die Charakterisierung von *Atrmi1* Mutanten aus *Arabidopsis thaliana* ergab einen wichtige Funktion in der Auflösung replikationsassoziiierter DNA-Schäden aber auch eine essentielle Rolle in der Prozessierung meiotischer Rekombinationsintermediate (Hartung *et al.*, 2007, 2008; Suer, 2008).

### 4.1 Funktionelle Domänenanalyse zu *AtRMI1 in planta*

RMI1 hat im Rahmen der Funktion des RTR-Komplex keine katalytische Funktion, deshalb ist es schwieriger seine Aufgabe im Komplex zu verstehen und umso wichtiger, die Rolle der einzelnen Domänen von RMI1 zu charakterisieren, um RMI1 genauer in die Abläufe der DNA-Reparatur einordnen zu können. Bisherige Untersuchungen zur Funktion der konservierten Domänen DUF1767, OB-fold Domäne 1 und OB-fold Domäne 2 erfolgten *in vitro* für das menschliche RMI1 (Raynard *et al.*, 2008). Ein Vorteil des pflanzlichen Modellorganismus im Vergleich zu mammalischen Zellkulturen oder Hefe ist die Möglichkeit die Funktion von Genen

in einem intakten und mehrzelligen Organismus zu untersuchen. Diese Arbeit ist die erste funktionelle Domänenanalyse von *AtRMI1* *in planta*.

Die Bereiche der zu deletierenden konservierten Domänen von *AtRMI1* wurden aufgrund bisheriger Studien und basierend auf Sequenzvergleichen bestimmt. Für die funktionellen Untersuchungen zu *AtRMI1* wurden insgesamt fünf cDNA Konstrukte kloniert. Eines mit der vollständigen Sequenz von *AtRMI1*, drei Deletionskonstrukte in denen jeweils eine der Domänen deletiert war und ein Doppeldeletionskonstrukt in dem der N-terminale Bereich aus DUF1767 und OB-fold Domäne 1 entfernt wurde. Für die *in vitro* Analysen wurden diese fünf Konstrukte über Agrobakterien-vermittelte Transformation stabil in die Mutanten *Atrmi1-1* und *Atrmi1-2* und den WT (IC9C) eingebracht. Die Auswahl genetisch unterschiedlicher Linien erfolgt bei der Selektion der Primärtransformanden (T1-Generation), denn jeder Samen der auf Selektionsmedium (PPT) keimt und gedeiht ist aus einem individuellen Transformationsereignis entstanden. In der darauffolgenden T2-Generation wurde das Saatgut von mehreren Primärtransformanden jeweils auf eine 3:1 (1:2:1) Aufspaltung anhand der PPT-Resistenz untersucht. Diese mendelsche Aufspaltung tritt nur dann auf, wenn die T-DNA PPT-Resistenzkassette in der T1-Generation hemizygot, an nur einem Ort im Genom vorlag (*single-locus*). In der F3-Generation wurde noch die Homozygotie der *single-locus* Linien in Bezug auf die T-DNA überprüft, um durch genetisch einheitliches Material konstante Ergebnisse zu erhalten. Bereits während der Linienetablierung wurde durch die Nutzung der PPT-Resistenz, die Expression des transformierten Konstruktes getestet. Zur Quantifizierung der Expression der rekombinanten *RMI1*-Varianten wurde das Expressionsniveau der einzelnen Linien durch Real-Time PCR ermittelt. Damit die Expressionslevel unabhängig vom Konstrukt oder der transformierten Linie verglichen werden konnten, wurde während der Real-Time PCR ein Fragment von 92 bp (*AtRMI1* bp 6 bis 98) amplifiziert, das sowohl in den Mutanten, als auch in den verschiedenen *RMI1*-Konstrukten unverändert vorliegt. Bei den verwendeten Linien wurde darauf geachtet, dass die Expression des Konstruktes, wenn auch teilweise nur gering, über dem Expressionsniveau der Mutante lag.

#### 4.1.1 Expression der *RMI1*-Varianten im Wildtyp (IC9C)

Um mögliche sekundäre Effekte durch die Expression der *RMI1*-Varianten auszuschließen, wurde jedes Konstrukt zusätzlich zu den *rmi1* Mutanten auch in die Wildtyplinie (IC9C) transformiert und mehrere genetisch verschiedene homozygote *single-locus* Linien etabliert. Für jedes Konstrukt wurden zwei transformierte Wildtyplinien ausgewählt. Die Expression der rekombinanten *RMI1*-Konstrukte in diesen Linien überstieg die Expression des natürlichen *RMI1* um ein Vielfaches. In Bezug auf die somatische Rekombination (spontan und Cisplatin-induziert) und auch bezüglich replikationsassoziierter Schäden durch MMS oder Cisplatin

konnte für keine der getesteten Linien ein deutlich vom Wildtyp abweichender Phänotyp nachgewiesen werden.

Die Linie IC9C::*RMI1*Δ*DUF*Δ*OB1* lag zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht als etablierte homozygote *single-locus* Line vor. Allerdings ist auch nicht davon auszugehen, dass die zusätzliche Deletion einer weiteren Domäne im Vergleich zu *RMI1*Δ*DUF* oder *RMI1*Δ*OB1* eine Auswirkung auf den Wildtyp zeigt. Der Aminosäurebereich, den dieses Konstrukt umfasst (AS 1 bis 100, AS 194 bis 233 und AS 259 bis 644), liegt ebenso in den Konstrukten *RMI1* und *RMI1*Δ*OB2* vor, die keine Veränderung der somatische Rekombinationsfrequenz und der DNA-Reparatur nach Cisplatin- oder MMS verursachten Schäden im Wildtyp bewirken.

Zusätzlich zum Konstrukt kann aber auch der Vorgang der ungerichteten Agrobakterien-vermittelten Transformation Auswirkungen haben. Zum einen, da die Integration der T-DNA nicht gezielt an einen bestimmten Ort im Genom erfolgt, kann durch das Einfügen der T-DNA ein endogener Genlocus unterbrochen werden. Dies könnte je nach der Funktion des zufällig getroffenen Gens auch Effekte auf die Untersuchungen haben, die im Laufe dieser Arbeit durchgeführt wurden. Zum anderen können aus verschiedenen Integrationsorten unterschiedliche Expressionslevel resultieren. Um eine Fehlinterpretation aufgrund sekundärer Effekte des Integrationsortes auszuschließen, wurden mehrere genetisch verschiedene Linien sowie die Expression der Konstrukte getestet.

#### 4.1.2 Komplementierung der *Atrmi1* Mutanten

Die vollständige Komplementation des *rmi1* Mutanten Phänotyps durch die Expression des rekombinanten *AtRMI1* ist die Grundlage für die weitere funktionelle Domänenanalyse. Daher wurde ein *RMI1*-Konstrukt kloniert, das den natürlichen ORF von *AtRMI1* unter Kontrolle des natürlichen Promotors und Terminators enthält. Durch die stabile Integration des Konstrukts konnte der hyperrekombinative Phänotyp und die Hypersensitivität gegenüber Cisplatin und MMS komplementiert werden. Möglicherweise resultiert die weiterhin leichte Sensitivität der Linie #463 (vgl. Abbildung 3.12) aus der geringeren Expression des Konstruktes (vgl. Abbildung 3.11). Allerdings genügt diese Expression, um den hyperrekombinativen Phänotyp zu komplementieren. Dass die HR und die DNA-Reparatur getrennt von einander betrachtet werden müssen, zeigt in diesem Zusammenhang auch die Linie #544 (*RMI1*Δ*OB2*-Konstrukt; Abbildung 3.17, 3.18). Diese Linie zeigt bei einer über 20-fachen Expression von *RMI1*Δ*OB2* im Vergleich zum Expressionslevel des natürlichen *RMI1* eine Komplementation des HR-Phänotyps aber keinerlei Komplementation der Hypersensitivität.

Ebenso konnte der starke meiotische Defekt der *rmi1-1* Mutante und die daraus resultierende Sterilität der Pflanzen mit dem *RMI1* Konstrukt komplementiert werden (vgl. Tabelle 3.1). Die Tatsache, dass nur bei 61 von 62 Pflanzen die Sterilität aufgehoben wurde, lässt sich mit dem sogenannten Positionseffekt erklären. Möglicherweise wurde die T-DNA in der einen sterilen Pflanze in einen transkriptionell inaktiven Bereich integriert oder durch die Integration der



T-DNA wurde ein weiteres funktionell wichtiges Gen unterbrochen. Beispielsweise konnten im Verlauf dieser Arbeit nach der Transformation von Wildtyppflanzen oder fertilen Mutanten, unabhängig vom verwendeten Konstrukt, mehrmals sterile Pflanzen identifiziert werden. Für die Komplementation der Sterilität der *rmi1-1* Mutante wurden die einzelnen Pflanzen der T1-Generation dahin gehend untersucht, ob Saatgut gebildet wurde oder nicht. Jede dieser Pflanzen entstammte einem individuellen Transformationsereignis. Durch die Selektion anhand der PPT-Resistenz konnte zumindest die Expression der Resistenzkassette des eingebrachten Konstruktes nachgewiesen werden. Die Expressionsanalysen der etablierten transgenen Linien zeigte, dass bei vorhandener PPT-Resistenz auch die verschiedenen *RMI1*-Konstrukte exprimiert werden. Da es in dieser Untersuchung nicht um eine Quantifizierung sondern um eine positiv-negativ Entscheidung ging, wurde darauf verzichtet das Expressionslevel des jeweiligen *RMI1*-Konstruktes in diesen Pflanzen zu testen. Die Komplementation konnte ebenfalls durch die Beobachtung männlicher Meiozyten nachgewiesen werden. Während für die *rmi1-1* Mutante starke Chromosomenfragmentierungen und ein Abbruch der Meiose zum Ende der ersten Reifeteilung charakteristisch sind, konnte in den Präparationen der Pollenmutterzellen von *rmi1-1::RMI1* der Verlauf der Meiose bis zur Bildung der Tetrade zum Ende der Meiose II beobachtet werden. Es konnten keine Stadien der Anaphase I mit zerrissenen Chromatinstrukturen identifiziert werden, wie sie für die *rmi1-1* Mutante typisch sind. Die Quantifizierung der Fertilität erfolgte durch die Ermittlung der Samenzahl pro Schote, mit einem Probenumfang von 25 Schoten. Hierfür wurde je Konstrukt eine etablierte Linie untersucht (vgl. Abbildung 3.17). Im Vergleich dazu wurde je eine ebenfalls transformierte WT Linie der gleichen Generation untersucht, um die Faktoren Transformation und Vermehrung miteinzubeziehen. Durch die Expression des rekombinanten *RMI1* kann auch in Bezug auf die Fertilität eine Komplementation des sterilen Phänotyps der *rmi1-1* Mutante bestätigt werden. Mit der Komplementation des charakteristischen somatischen und meiotischen Phänotyps der beiden Mutanten *rmi1-1* und *rmi1-2* konnte gezeigt werden, dass die beschriebenen Defekte allein auf die Mutation in *AtRMI1* zurückzuführen sind. Des Weiteren weist diese Komplementation auf die Bildung eines intakten rekombinanten Proteins hin. Es wurde zwar mit Hilfe von Real-Time PCR die Transkriptmenge quantifiziert, dies allein ist aber nicht ausschlaggebend für ein funktionelles Protein. Aufgrund der Tatsache, dass die Expression der vollständigen cDNA-Sequenz von *RMI1* in den Transformationslinien zur Komplementation führt, ist davon auszugehen, dass der gewählte Ansatz zur Expression der verschiedenen *RMI1*-Konstrukte grundlegend funktioniert und ein korrekt gefaltetes Protein entstehen kann. Sollte durch die Deletionskonstrukte keine Komplementation des *rmi1* Phänotyps erreicht werden, ist davon auszugehen, dass die jeweilige nicht vorhandene Domäne ausschlaggebend ist.

#### 4.1.3 Funktion des N-Terminus (DUF1767 Domäne und OB-fold Domäne 1)

Der Bereich, der im Konstrukt *RMI1 $\Delta$ DUF* deletiert wurde, entspricht der Sequenz der konservierten DUF1767 Domäne (pfam08585) (Chelysheva *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass die DUF1767 Domäne weniger der Interaktion mit einem der anderen RTR-Komplexpartner dient, als vielmehr der korrekten Proteinfaltung und der Stabilität des gesamten Komplexes (Wang *et al.*, 2010; Ashton *et al.*, 2011).

Die Expression des *RMI1 $\Delta$ DUF* Konstrukts in der *rmi1-2* Mutante führt nicht zur Komplementation des hypersensitiven Phänotyps der Mutante und auch die Funktion bezüglich der somatischen HR kann nur teilweise übernommen werden. Demnach ist die Funktion von der DUF1767 Domäne in Betrachtung der somatischen HR teilweise entbehrlich, nicht aber für die Reparatur von replikationsassoziierten DNA-Schäden.

C-terminal von der DUF1767 Domäne liegt die OB-fold Domäne 1. Für das menschliche Homolog wurde 2005 eine putative OB-fold identifiziert, die den Bereich von AA 115 bis AA 191 umfasst (Yin *et al.*, 2005). Drei Jahre später wurde in diesem Bereich der Interaktionsbereich (AA 151 bis AA 211) für die Topoisomerase 3 $\alpha$  und die Helikase BLM des RTR-Komplexes ermittelt. In diesem Abschnitt wurde im mammalian System eine essentielle Funktion für das konservierte Lysin (K166) in der Bindung der Topoisomerase nachgewiesen (Raynard *et al.*, 2008).

Der deletierte Bereich des Konstruktes *RMI1 $\Delta$ OB1* beinhaltet das konservierte Lysin von *A. thaliana* (K235), wurde aber im Vergleich zu dem Sequenzabschnitt den Raynard *et al.* 2008 für die Interaktion der Topoisomerase und Helikase ermittelten, noch weiter eingeschränkt.

Die Deletion des Bereichs AS 234 bis AS 258 (OB-fold Domäne 1) lässt ebenso wie die Deletion der DUF1767 Domäne keine Komplementation der Hypersensitivität zu. Die Frequenz der somatischen HR kann durch die Expression des rekombinanten *RMI1 $\Delta$ OB1* im Vergleich zur *rmi1-2* Mutante reduziert werden, entspricht aber nicht der Rekombinationsfrequenz des Wildtyps.

Sowohl die DUF1767 Domäne als auch der OB1 Bereich nehmen bezüglich der Unterdrückung der somatischen homologen Rekombination (spontan und Cisplatin-induziert) und der Reparatur von Schäden, die zur Blockade der Replikation führen, eine unterschiedliche Funktion ein. Die OB-fold Domäne 1, die durch das konservierte Lysin (K235) die Interaktion zur Topoisomerase ermöglicht, aber auch die DUF1767 Domäne sind relevant für die Reparatur Cisplatin- und MMS verursachter DNA-Schäden. Dies wird auch durch neuste Ergebnisse zu *HsRMI1* bestätigt, wonach RMI1 wesentlich am Voranschreiten der Replikationsgabel beteiligt ist, was sowohl ohne als auch mit Induktion von Replikationsstress gezeigt werden konnte. Auch im Menschen ist die Interaktion von RMI1, BLM und TOP3 $\alpha$  ausschlaggebend, um auf Replikationsstress zu reagieren (Yang *et al.*, 2012).

Die Genotoxine MMS und Cisplatin führen durch Methylierung beziehungsweise Intrastrang-Quervernetzungen der DNA zur Blockade der Replikationsgabel in der S-Phase. Wird während

der Replikation die Synthese an Leit- und Folgestrang entkoppelt, entstehen DNA-Einzelstrangbereiche, die zur Initiierung der *template-switch* Mechanismen der HR führen (Cox *et al.*, 2000; Li und Heyer, 2008; Budzowska und Kanaar, 2009). Diese beruhen auf der Nutzung der homologen Sequenz des Schwesterchromatids zur Umgehung des DNA-Schadens. Die Auflösung der Intermediate über einen *template-switch* Mechanismus führt aber nur zur Schadenstoleranz, nicht zur Reparatur des Schadens. Eine direkte Reparatur von Schäden an der Replikationsgabel ist bei einem einseitig vorliegenden DSB möglich. Dieser kann entstehen, wenn durch die Aktivität einer strukturspezifischen Endonuklease ein Bruch im beschädigten parentalen Strang eingefügt wird oder wenn bereits ein ESB im parentalen Strang vorliegt. In beiden Fällen würde durch den exonukleolytischen Abbau des 5'-Überhangs ein freies 3'-Ende entstehen, das in die homologe Sequenz des Schwesterchromatids invadieren kann und die Synthese des Leit- und Folgestrangs ermöglicht. Die direkte Reparatur über HR würde im Gegensatz zum *template-switching*, durch den exonukleolytischen Abbau des beschädigten Stranges zur Reparatur des DNA-Schadens und zu einer intakten Replikationsgabel führen. Zusätzlich ermöglicht die direkte Reparatur auch die Rekonstruktion des funktionellen GUS-Konstruktes der IC9C-Linie, die in der vorliegenden Arbeit zur Ermittlung der Rekombinationsfrequenz verwendet wurde.

In Bezug auf die Restaurierung des GUS-Fragmentes und der damit gemessenen HR-Frequenz liegt die Vermutung nahe, dass der RTR-Komplex aufgrund der fehlenden DUF1767 Domäne beziehungsweise der fehlenden OB-fold Domäne 1 von RMI1 nicht mehr in der Lage ist die somatische HR vollständig zu unterdrücken, wie es durch das vollständige *RMI1*-Konstrukt gelungen ist. Der Grund dafür ist nicht auf mRNA-Ebene zu suchen, da auch eine geringe Expression des Konstrukts zur selben intermediären HR-Frequenz führt wie eine stärkere Expression. Möglicherweise führt das fehlen der N-terminalen Domänen zu Defekten in der Proteinfaltung (DUF1767 Domäne) beziehungsweise aufgrund fehlender Interaktionsdomäne (OB-fold Domäne 1) zu einer Instabilität des RTR-Komplexes, wodurch dessen Funktion als ganzer Komplex eingeschränkt wäre. Es ist ebenfalls denkbar, dass die Halbwertszeit von RMI1 über den N-Terminus gesteuert wird, wie es für die meisten Proteine der Fall ist (Varshavsky, 1997). Durch eine beschleunigte Degradation würde das Verhältnis der Komponenten des RTR-Komplex gestört werden, was sich auch auf die Stabilität des Komplexes auswirken könnte. Es konnte gezeigt werden, dass das Lokalisationmuster jedes Komplexpartners abhängig ist von der Anwesenheit der anderen beiden Komplexpartner (Yang *et al.*, 2012).

Eine Erklärung könnte auch ein weiterer Interaktionspartner von RMI1 sein, der in der Lage ist, die Funktion der RecQ-Helikase teilweise zu übernehmen beziehungsweise die Topoisomerase im Komplex zu binden. Im Menschen käme hierfür FANCM in Frage, das über die OB-fold Domäne 2 mit dem RTR-Komplex interagiert (Singh *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Deans und West, 2009). Durch seine Translokaseaktivität wäre es in geringem Maße fähig die *branch*

*migration* Aktivität der Helikase zu kompensieren und durch eine Interaktionsdomäne die Topoisomerase zu binden (Meetei *et al.*, 2005; Gari *et al.*, 2008a, 2008b).

Allerdings ist ein weiterer Interaktionspartner von *RMI1* in *A. thaliana* eher unwahrscheinlich, da das Ausschalten jedes Komplexpartner (RECQ4A, TOP3 $\alpha$  und RMI1) zu ein und demselben hyperrekombinativen Phänotyp führt. Könnte in *A. thaliana* beispielsweise die Helikaseaktivität teilweise durch FANCM ersetzt werden, würde die alleinige Mutation von *recq4A* nicht zur selben HR-Rate führen wie die Mutation der anderen Komplexpartner. Des Weiteren ist das MM2 (*FANCM* *motif 2*) Motiv von *HsFANCM*, welches für die Interaktion mit dem RMI-Subkomplex (RMI1 und RMI2) verantwortlich ist, nicht in *AtFANCM* konserviert (Deans *et al.*, 2009).

Der meiotische Defekt der *rmi1* Mutanten äußert sich im Abbruch der Meiose zum Ende der ersten Reifeteilung. Aufgrund der fehlenden Interaktion mit der Topoisomerase werden die Hemikatenan-Strukturen nicht aufgelöst und es kommt zur starken Fragmentierung der homologen Chromosomen während der Anaphase I. Dieser Defekt kann weder durch die Expression des rekombinanten *RMI1 $\Delta$ DUF* noch durch *RMI1 $\Delta$ OB1* kompensiert werden. Geht man davon aus, dass die DUF1767 Domäne aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Domäne III von *MtRuvA* aus *Mycobacterium tuberculosis* auch an Interaktion mit der Helikase beteiligt sein könnte, scheint für die Bildung des Hemikatenans die Interaktion der Helikase mit RMI1 beziehungsweise dem RTR-Komplex nicht notwendig zu sein. Da auch in der *rmi1-1* Mutante der N-terminale Bereich der DUF1767 Domäne und der OB-fold Domäne 1 deletiert ist, kann die Helikaseaktivität also auch nicht durch den N-Terminus des endogenen Restproteins stimuliert werden. Da die Expression der beiden RMI1-Varianten *RMI1 $\Delta$ DUF* oder *RMI1 $\Delta$ OB1* nicht zu einer Verbesserung in der Fertilität der *rmi1-1* Mutante führt, muss davon ausgegangen werden, dass beide Domänen für einen intakten RTR-Komplex benötigt werden um Rekombinationsintermediate der meiotischen HR zu prozessieren.

#### 4.1.4 Funktion des C-Terminus (OB-fold Domäne 2)

Die OB-fold Domäne 2 von *HsRMI1* konnte über Kristallstrukturen des RMI-Subkomplexes als Interaktionsdomäne für *HsRMI2* (OB-fold Domäne 3) und auch für *HsFANCM* (MM2 Motiv) identifiziert werden (Singh *et al.*, 2008; Deans und West, 2009). Durch *HsRMI2* soll die Stabilität des Komplexes erhöht und die *Dissolution* Reaktion stimuliert werden. Demnach führt der Verlust von RMI2 im menschlichen System zur Destabilisierung des RTR-Komplexes und zu einer erhöhten Rate von SCEs (Xu *et al.*, 2008). Infolge einer Behandlung mit MMS reagieren *rmi2* Zellen mit Hypersensitivität im Vergleich zum WT. Die Interaktion von RMI2 mit der OB-fold Domäne 2 von RMI1 führt zum Verlust der DNA-Bindeaktivität des RMI-Subkomplexes, die durch die zusätzliche Interaktion von FANCM mit dem RMI-Subkomplex wieder hergestellt werden könnte (Raynard *et al.*, 2008).

Wie bereits erwähnt, konnte in *A. thaliana* bisher keine Funktion für RMI2 in der Reparatur Cisplatin- und MMS-induzierter DNA-Schäden gezeigt werden. Eine Beteiligung an der Unterdrückung von CO-Ereignissen in der replikationsabhängigen HR ist aufgrund einer leicht erhöhten HR-Rate der *rmi2* Mutante möglich (Schröpfer, 2012). Die Interaktion mit AtFANCM ist für AtRMI2 fraglich, da das MM2 Motiv, das im Menschen für die Interaktion benötigt wird, in *A. thaliana* nicht konserviert ist.

Für *A. thaliana* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich der hyperrekombinative Phänotyp der *rmi1-2* Mutante und auch der meiotische Defekt der *rmi1-1* Mutante durch das Konstrukt RMI1ΔOB2 vollständig komplementieren lassen. Demnach scheint im Gegensatz zum menschlichen System weder die Interaktion mit RMI2 noch mit einem weiteren Interaktionspartner für die HR in *A. thaliana* notwendig zu sein.

Die Hypersensitivität gegenüber MMS und Cisplatin dagegen kann nicht vollständig durch RMI1ΔOB2 komplementiert werden, weshalb vermutet werden könnte, dass die Interaktion mit RMI2 für die Reparatur replikationsassoziierter Schäden benötigt wird. Allerdings konnte in der bisherigen Charakterisierung von AtRMI2 für die T-DNA-Insertionsmutante *Atrmi2-2* keine Sensitivität gegenüber MMS- und Cisplatin verursachten DNA-Schäden festgestellt werden. Jedoch müssen zur Bestätigung dieses Phänotyps weitere *rmi2* Mutanten untersucht werden, da die *Atrmi2-2* Mutante noch eine Expression nach der T-DNA-Insertion aufweist, wodurch ein nahezu vollständiges Protein entstehen könnte.

Des Weiteren kann die Sensitivität einiger Linien auch auf eine DNA-unabhängige Schädigungen der Zelle zurückzuführen sein, da für die Ermittlung der Sensitivität eine relativ hohe Konzentration an Genotoxin im Vergleich zum Rekombinationstest eingesetzt wird.

Um die Funktion der OB-fold Domäne 2 als mögliche Interaktionsdomäne für AtRMI2 einschätzen zu können, ist auch die Charakterisierung weiterer *Atrmi2* Mutanten notwendig. Es könnten neue Erkenntnisse bezüglich gemeinsamer Funktionen über die Kreuzung der beiden Einzelmutanten (*Atrmi1-1* beziehungsweise *Atrmi1-2* mit *Atrmi2* und auch über Kreuzungen mit den Linien *rmi1-2* IC9C::RMI1ΔDUF oder *rmi1-2* IC9C::RMI1ΔOB1 erreicht werden.

## 4.2 Expression verschiedener Resolvasen in *Atrmi1-1*

Im Laufe dieser Arbeit wurden mehrere Konstrukte mit Resolvasen kloniert, die anhand ihrer meiotischen Expression zur Aufhebung des sterilen Phänotyps der *Atrmi1-1* Mutante führen sollten. Durch die Überexpression der Nukleasen *EcRuvABC*, *EcRusA*, *ScSlx1/ScSlx4*, *AtGEN1* und *AtMUS81/AtEME1A* sollte die Auflösung der dHJ in der Meiose über den *Resolution* Mechanismus begünstigt werden. Dies würde es ermöglichen, die Anzahl der COs in der Meiose zu erhöhen, da der *Dissolution* Mechanismus ausschließlich zu NCOs führt. Die Expression der Resolvase-Konstrukte sollte somit die Entstehung von fertilen *rmi1-1<sup>-/-</sup>* Pflanzen

in der T1-Generation ermöglichen, wenn der Mechanismus der *Dissolution* und damit die Bildung des Hemikatenans umgangen wird.

Alle Konstrukte wurden in hemizygote *rmi1-1* Pflanzen transformiert. In der T1-Generation wurden anhand der PPT-Resistenz diejenigen Pflanzen selektiert, welche die T-DNA enthielten. Diese Pflanzen wurden bezüglich des *AtRMI1*-Locus und der *rmi1-1* Mutation genotypisiert und bis zur Samenreife kultiviert. Erst dann konnte verifiziert werden, ob die Expression eines der Resolvase-Konstrukte den sterilen *rmi1-1* Phänotyp unterbinden kann. Es konnte aber keines der eingebrachten Konstrukte die Sterilität von *rmi1-1* aufheben.

Die Gründe hierfür sind wahrscheinlich weniger im prinzipiellen Aufbau der Resolvase-Konstrukte zu finden. Ebenso ist es unwahrscheinlich dass alle Konstrukte aufgrund von Mutationen fehlerhaft sind. Sämtliche Konstrukte wurden vor der Transformation in Agrobakterien sequenziert und es ist nicht anzunehmen dass während Kultivierung der Agrobakterien alle Konstrukte durch Mutationen verändert wurden.

Die Verwendung der T2A-Peptide zur Klonierung von *RuvABC* als einen ORF sollte ebenfalls nicht der Grund für die fehlgeschlagene Komplementation sein, da die verwendete Sequenz bereits erfolgreich zur Expression von Zinkfinger-Nukleasen in *A. thaliana* eingesetzt wird (Zhang *et al.*, 2009). Natürlich wäre es trotzdem möglich, dass während der Translation vermehrt Polyproteine anstatt einzelner Proteine entstehen und so die Komplexbildung gestört wäre. Dies hätte aber auch nicht über die Ermittlung der Expression detektiert werden können, da die Trennung in einzelne Proteine erst während der Translation stattfindet (Luke *et al.*, 2010).

Um den Transport der bakteriellen Proteine in den Kern zu ermöglichen, wurde jeweils eine NLS Sequenz am N-Terminus der einzelnen Proteine angefügt. Auch diese Sequenz wurde bereits für verschiedene pflanzliche Systeme und auch für *A. thaliana* erfolgreich verwendet (Grebek et al., 1997; Karimi et al., 2007).

Für die Expression der heterologen Resolvasen wurde zwar von einer Codon-Optimierung abgesehen, dies erfolgte aber nur deshalb, weil der *Codon-Adaptation-Index* (CAI) der einzelnen Gene in *E. coli* beziehungsweise in *S. cerevisiae* nur wenig vom CAI in *A. thaliana* abwich.

Vielmehr scheint der Grund für die fehlende Aufhebung der Sterilität von *Atrmi1-1* daran zu liegen, dass durch die Aktivität der Helikase bereits das toxische Hemikatenan gebildet und der *Dissolution* Mechanismus eingeleitet wurde. Anscheinend ist es durch die Überexpression verschiedener Resolvasen nicht möglich, steuernd in die Wahl zwischen *Resolution* und *Dissolution* Mechanismus einzugreifen. Wahrscheinlich ist es auch nicht möglich, die Hemikatenan-Struktur wieder in eine dHJ zu überführen oder das Hemikatenan aufgrund seiner Struktur durch Resolvasen aufzulösen.

Die Verwendung der sterilen *rmi1-1* Mutante wäre eine relativ schnelle und einfache Methode gewesen, die mögliche Bildung von COs über den Resolution Mechanismus zu testen.

Natürlich wäre die CO Bildung weiterhin abhängig von der Orientierung der Schnitte der Resolvasen.

### 4.3 Genetische Interaktion zwischen *AtRMI1* und *AtMUS81*

Die Generierung von Doppelmutanten ist häufig eine Möglichkeit, die Beteiligung von verschiedenen Proteinen an den selben Mechanismen festzustellen. In dieser Arbeit sollte unter die Doppelmutante aus *Atrmi1-2* und *Atmus81-1* generiert werden. Dies erwies sich aber als sehr schwierig, da keiner Pflanze der doppelt homozygote Genotyp *rmi1-2 mus81-1* zugeordnet werden konnte. Da in der F<sub>2</sub>-Generation der Kreuzung die Mutation *rmi1-2* homozygot und die Mutation *mus81-1* hemizygot vorlag, hätten nach Mendel in der Folgegeneration ungefähr  $\frac{1}{4}$  der Pflanzen einem doppelt homozygoten Genotyp bezüglich *rmi1-2* und *mus81-1* entsprechend müssen. Insgesamt wurden 160 Pflanzen durch PCR-basierte Genotypierung auf ihren Genotyp bezüglich des Locus *AtMUS81* überprüft. Statistisch gesehen, hätten davon 40 Pflanzen doppelt homozygot sein müssen.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Mutation *recq4A-1 mus81-1* zu einem starken Wachstumsdefekt der Pflanzen führt und dieselben nach etwa zwei Wochen absterben, wurde postuliert dass RECQ4A und MUS81 an einem parallelen Mechanismus der DNA-Reparatur beteiligt sind (Hartung *et al.*, 2006). Durch die zusätzliche Mutation von *RAD51C*, welches an initialen Schritten der HR beteiligt ist, wurde die Letalität der Pflanzen aufgehoben. Daher wird vermutet, dass es sich um HR Mechanismen zur Reparatur replikationsassoziiertes DNA-Schäden handeln muss (Mannuss *et al.*, 2010).

Aufgrund der Kenntnis über die synthetische Letalität von *recq4A-1 mus81-1*, die in Hefe und im menschlichen System ebenfalls für die anderen RTR-Komplexparker beobachtet werden konnte, wurden das Saatgut der F<sub>2</sub>-Generation nicht auf Erde, sondern steril auf Nährmedium ausgebracht (Mullen *et al.*, 2001; Doe *et al.*, 2002; Fabre *et al.*, 2002; Hartung *et al.*, 2006). Dies sollte ermöglichen, sowohl nicht keimende Samen, als auch früh absterbende Keimlinge quantifizieren zu können. Es konnte jedoch nur ein sehr geringer Anteil an nicht keimfähigen Samen identifiziert werden. Dieser entsprach bei weitem nicht den 40 erwarteten Doppelmutanten. Ebenso konnte keine Pflanze mit einem schweren Wachstumsdefekt ausgemacht werden. In Bezug auf die Doppelmutante *rmi1-1 mus81-1* konnten die selben Beobachtungen gemacht werden (F. Hartung, persönliche Mitteilung). Durch die genauere Betrachtung der Schoten von *rmi1-2 mus81-1<sup>+/-</sup>* konnten mehrfach leere Samenanlagen und nur ein geringer Anteil an nicht keimfähigen Samen identifiziert werden. Die gestörte Samenbildung weist auf einen starken somatischen, aber nicht auf einen meiotischen Defekt hin. Denn erst nach der Meiose kann durch die Verschmelzung der parentalen Gameten der F<sub>2</sub>-Generation in der Zygote der Genotyp *rmi1-2 mus81-1* entstehen. Aufgrund der bereits beschriebenen Annahme, dass MUS81 und der RTR-Komplex an parallelen HR-Mechanismen zur Prozessierung blockierter Replikationsgabeln arbeiten, wurde mit einem deutlichen

Wachstumsdefekt und auch mit synthetischer Letalität gerechnet. Es stellt sich aber die Frage, warum es gar nicht erst zur Bildung der Samen kommt.

Im Kontext zur Doppelmutante *recq4A-1 mus81-1* könnte ein dritter paralleler HR-Mechanismus vermuten werden, der hauptsächlich in der Embryonalentwicklung aktiv ist und einen Teil der auftretenden DNA-Schäden prozessieren kann. Fällt dieser dritte HR-Weg expressionsbedingt weg, häufen sich in der Linie *recq4A-1 mus81-1* Rekombinationsintermediate, die durch Hemmung von Replikation und Transkription vor allem sich schnell teilendes Gewebe stark schädigen.

In Bezug auf den Prozessierungsfortschritt des HR Mechanismus in *recq4A* Mutanten und *rmi1-2* Mutanten, könnte auch der Prozessierungsgrad der Rekombinationsintermediate den Hinweis darauf geben, warum die zusätzliche Mutation von *RMI1* in *mus81* defizienten Pflanzen zu einem wesentlich drastischeren Phänotyp führt als die Mutation von *recq4A*. Die Aufgabe von *RECQ4A* im RTR-Komplex ist die Bildung des Hemikatenans aus der dHJ. Diese Hemikatenan-Struktur wird durch *TOP3α* und dem Strukturprotein *RMI1* zu NCOs aufgelöst. Durch die Mutation von *RECQ4A* wird die Einleitung des *Dissolution* Mechanismus verhindert und die dHJ als Rekombinationsintermediat erlaubt noch die Auflösung über den Weg der *Resolution*. Dieser Weg könnte neben *MUS81/EME1A* noch über weitere Resolvasen, möglicherweise *AtGEN1* und *AtSEND1*, bestritten werden. Allerdings sind in diesem Zusammenhang keine oder nicht ausreichend Expressionsdaten zu *AtGEN1* und *AtSEND1* veröffentlicht, sodass nicht klar ist ob die Expression im Embryo ausreichend wäre, um dort die Funktion von *RECQ4A* und *MUS81* zumindest teilweise zu kompensieren.

In Betrachtung der Funktion von *RMI1* im RTR-Komplex, wird klar, dass in der *rmi1* Mutante bereits das Hemikatenan gebildet und somit der *Dissolution* Mechanismus eingeleitet wurde. Da es weder Hinweise gibt, dass die Hemikatenan-Bildung rückgängig gemacht werden kann, noch darüber, dass es zur Auflösung des Hemikatenans noch eine zusätzliche Möglichkeit neben *TOP3α* und *RMI1* gibt, werden in der Doppelmutante *rmi1-2 mus81-1* kontinuierlich toxische Rekombinationsintermediate gebildet, die nicht mehr weiter prozessiert oder aufgelöst werden können.

Der zusätzliche Versuch, die Letalität der *rmi1-2 mus81-1* Mutante durch die Expression der rekombinanten *RMI1*-Varianten (*RMI1*, *RMI1ΔDUF*, *RMI1ΔOB1* und *RMI1ΔOB2*) aufzuheben, bestätigte die Annahme, dass ein intakter RTR-Komplex sowie dessen Funktion benötigt wird. Nur das vollständige *RMI1*-Konstrukt ist in der Lage, die gestörte Samenbildung aufzuheben und ermöglicht den doppelt homozygoten Genotyp *rmi1-2 mus81-1*.

Des Weiteren wurde versucht, die fehlende Auflösung von replikationsassoziierten Rekombinationsintermediaten in der Doppelmutante *rmi1-2 mus81-1* über die Expression anderer, putativer HJ-Resolvasen zu kompensieren. Die Expression der Resolvasen und Endonukleasen (*AtGEN1*, *AtMUS81/AtEME1A*, *ScSlx1/ScSlx4*, *EcRusA* und *EcRuvABC*)



erfolgte unter der Kontrolle der meiotisch aktiven Promotoren von *AtDMC1* und *AtRMI2*. Allerdings führte keines dieser Konstrukte zur Aufhebung des letalen Phänotyps.

Dies lässt sich aber wahrscheinlich über die verwendeten Promotoren erklären. Da diese Konstrukte für die Aufhebung des sterilen Phänotyps von *rmi1-1* gedacht waren, wurden dementsprechend Promotoren gewählt, die eine starke Expression in der Meiose ermöglichen. Trotzdem führen beide Promotoren auch zu einer Expression in somatischen Zellen. Die Expression während der Entwicklung des Embryos ist aber sehr gering und dürfte daher vermutlich nicht ausreichen, um das *mus81*-Defizit zu kompensieren (Schmid *et al.*, 2005). In Bezug auf das Konstrukt des Endonukleasekomplexes *AtMUS81/AtEME1A*, dessen rekombinante Expression am wahrscheinlichsten den frühen embryoletalen Phänotyp der *rmi1-2 mus81-1* Doppelmutante aufheben sollte, wäre eine zu geringe Expression eine mögliche Erklärung für die nicht erfolgte Komplementation.

Zur Überprüfung der Funktionalität der Resolvase-Konstrukte würde sich anbieten die Expression unter Kontrolle eines embryonalen Promotors zu testen. Da bei der Planung der Konstrukte darauf geachtet wurde, dass der Promotor möglichst einfach und unabhängig von der neuen Promotorsequenz austauschbar ist, sollte der Promotorwechsel kein Problem darstellen. In Kombination mit der *rmi1-2<sup>-</sup> mus81-1* Mutante könnte sowohl die Funktionalität des Konstruktes zur Expression des Endonukleasekomplexes *AtMUS81/AtEME1A* getestet werden, aber auch die heterolog exprimierten Resolvasen. Interessant wäre auch die Funktionalität der T2A-Peptide für die Expression mehrerer Gene unter der Kontrolle eines Promotors, da in der Vergangenheit schon Probleme durch *Gene-silencing* bei der Nutzung mehrerer gleicher Promotoren aufgetreten sind.

In weiteren Untersuchungen zur Doppelmutante *rmi1-2 mus81-1* sollte die Hypothese des früh embryoletalen Phänotyps zum einen durch die Quantifizierung leerer Samenanlagen beziehungsweise toter Samen bestätigt werden. Zusätzlich würde die Untersuchung der Embryoentwicklung Auskunft darüber geben, wie schnell beziehungsweise in welchem Stadium sich die nicht prozessierten Rekombinationsintermediate toxisch auf die Zellen auswirken. Um den Phänotyp der *rmi1-2<sup>-</sup> mus81-1<sup>-</sup>* auf Rekombinationsintermediate der HR zu beschränken, sollte dies durch die Aufhebung des Phänotyps durch die zusätzliche Mutation von *rad51C* bestätigt werden.

## 4.4 Zusammenfassung

Das Strukturprotein RMI1 ist ein Teil des evolutionär konservierten RTR-Komplexes, der aus einer RecQ-Helikase, einer Typ IA Topoisomerase und dem strukturellen Protein RMI1 besteht. In *Arabidopsis thaliana* wird der RTR-Komplex von der RecQ-Helikase RECQ4A, der Topoisomerase 3 $\alpha$  und RMI1 gebildet. Der RTR-Komplex spielt durch seine Funktion in der Auflösung von dHJ eine wichtige Rolle an der Erhaltung der Genomstabilität. Da die Prozessierung von Rekombinationsintermediaten über den *Dissolution* Mechanismus ausschließlich zu NCO-Produkten führt, ist der RTR-Komplex essentiell an der Unterdrückung von somatischen und auch meiotischen COs beteiligt. RMI1 selbst hat keine katalytische Funktion, es wird aber für die Komplexbildung benötigt und stimuliert die *Dissolution* Reaktion. Wie auch das menschliche Homolog enthält *AtRMI1* drei konservierte Domänen: Im N-Terminus die DUF1767 Domäne und die OB-fold Domäne 1 und im C-Terminus die OB-fold Domäne 2.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Komplementation der *rmi1*-Mutantenphänotypen gezeigt werden, dass allein die Mutationen im Genlocus *AtRMI1* für den hyperrekombinativen Phänotyp, die Hypersensitivität gegenüber Cisplatin und MMS und die meiotischen Defekte der beiden Mutanten *Atrmi1-1* und *Atrmi1-2* verantwortlich sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die konservierte DUF1767 Domäne und auch die OB-fold Domäne 1 essentiell für die Funktion von RMI1 in der DNA-Reparatur von Cisplatin- und MMS-induzierten Schäden und in der meiotischen homologen Rekombination sind. In der somatischen HR dagegen haben beide Domänen nur eine partielle Funktion. Im Gegensatz dazu ist die OB-fold Domäne 2 von *AtRMI1* beteiligt an der Reparatur replikationsassoziiierter DNA-Schäden, aber ist nicht essentiell für die Auflösung von Rekombinationsintermediaten der somatischen und meiotischen HR.

Die Aufhebung der Sterilität von *Atrmi1-1* Pflanzen und somit die Erhöhung der CO-Rate konnte mit der Expression von *AtGEN1*, *AtMUS81/AtEME1A*, *ScSLX1/ScSLX4*, *EcRuvABC* beziehungsweise *EcRusA* nicht erreicht werden. Dies weist darauf hin, dass die zusätzliche Expression von putativen HJ-Resolvasen und Endonukleasen keine Auswirkung auf den Ablauf des DSB-Reparaturwegs hat. Es ist zu vermuten, dass weiterhin die Bildung von Hemikatenan-Strukturen zu Beginn des *Dissolution* Mechanismus erfolgt, ohne dass eine Auflösung über TOP3 $\alpha$  und RMI1 möglich wäre. Diese Hemikatenan-Strukturen können weder zurück in die dHJ-Konformation überführt werden, noch über die exprimierten Resolvasen und Endonukleasen weiter prozessiert werden.

Des Weiteren konnte durch die Kreuzung der Mutanten *Atrmi1-2* und *Atmus81-1* in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich deren Kombination in einem schweren Defekt in der Samenbildung äußert. Dieser Defekt ist darauf zurückzuführen, dass die beiden Proteine *AtRMI1* und *AtMUS81* an zwei wichtigen parallelen Mechanismen der somatischen HR beteiligt sind.

## 4.5 Summary

The structural protein RMI1 is part of the highly conserved RTR complex. The complex consists of a RecQ helicase, a type IA topoisomerase and the structural protein RMI1. In *Arabidopsis thaliana* the RTR complex is composed of the RecQ helicase RECQ4A, the topoisomerase 3 $\alpha$  and RMI1. The complex is essential for maintaining genome stability because the dissolution of recombination intermediates can only lead to non crossover products, thus the RTR complex is involved in suppression of crossover products in somatic and meiotic HR. RMI1 itself has no catalytic function, but is required to stimulate the formation of the complex and it has been shown to promote the dissolution reaction. Similar to its mammalian homologue, *AtRMI1* is composed of several domains: a N-terminal DUF1767 domain and the OB-fold domain 1 followed by the OB-fold domain 2 in the C-terminal part of the protein.

Through the complementation of the *rmi1* mutant phenotypes in hyperrecombination, hypersensitivity against cisplatin and MMS and also the meiotic defect by the *RMI1* full length construct, it could be shown that the defects of the *rmi1* mutants is only due to the mutation of *AtRMI1*. Further it was possible to define the function of the 3 conserved domains: the DUF1767 domain and the OB-fold domain 1 are both necessary for the function of RMI1 in DNA repair. These domains are partially dispensable for the function of RMI1 in somatic HR but not for the dissolution of meiotic recombination intermediates. The OB-fold domain 2 is neither necessary for HR in somatic cells nor for HR in meiotic cells, but it seems to have a minor function in DNA repair.

Another part of this work was to try to rescue the sterile phenotyp of the *Atrmi1-1* mutant and to increase the number of COs by the expression of *AtGEN1*, *AtMUS81/AtEME1A*, *ScSLX1/ScSLX4*, *EcRuvABC* or *EcRusA*. The expression of these resolvases or endonucleases had no effect on the selection of the recombination pathway for DSB repair, indicating that there are still hemicatenane structures present even though they are not resolved. It seems to be neither the possibility to convert the hemicatenane back into dHJ conformation nor that these recombination intermediates are resolved by the recombinantly expressed proteins.

The third aim of this work was to generate double mutants of *Atrmi1-2* and *Atmus81-1*. The homozygous double mutant *Atrmi1-2 Atmus81-1* displays an early defect in seed development. This result supports the assumption that these two proteins of homologous recombination repair function at two parallel and fundamental recombination pathways in somatic cells.

## 5 Literaturverzeichnis

- 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**, 896-908.
- Abraham, J., Lemmers, B., Hande, M.P., Moynahan, M.E., Chahwan, C., Ciccio, A., Essers, J., Hanada, K., Chahwan, R., Khaw, A.K., McPherson, P., Shehabeldin, A., Laister, R., Arrowsmith, C., Kanaar, R., West, S.C., Jasin, M., and Hakem, R.** (2003). Eme1 is involved in DNA damage processing and maintenance of genomic stability in mammalian cells. *Embo J* **22**, 6137-6147.
- Ahmad, A., Robinson, A.R., Duensing, A., van Druenen, E., Beverloo, H.B., Weisberg, D.B., Hasty, P., Hoeijmakers, J.H., and Niedernhofer, L.J.** (2008). ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **28**, 5082-5092.
- Allers, T., and Lichten, M.** (2001). Intermediates of yeast meiotic recombination contain heteroduplex DNA. *Mol Cell* **8**, 225-231.
- 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., Gadriab, 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., Risseuw, 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**, 653-657.
- Andersen, P.L., Xu, F., and Xiao, W.** (2008). Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res* **18**, 162-173.
- 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**, 1058-1066.
- Aravind, L., and Koonin, E.V.** (2000a). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci* **25**, 112-114.
- Aravind, L., Makarova, K.S., and Koonin, E.V.** (2000b). SURVEY AND SUMMARY: holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res* **28**, 3417-3432.
- 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**, 1921-1933.
- Atkins, J.F., Wills, N.M., Loughran, G., Wu, C.Y., Parsawar, K., Ryan, M.D., Wang, C.H., and Nelson, C.C.** (2007). A case for "StopGo": reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go). *Rna* **13**, 803-810.
- Aylon, Y., and Kupiec, M.** (2003). The checkpoint protein Rad24 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in processing double-strand break ends and in recombination partner choice. *Mol Cell Biol* **23**, 6585-6596.
- Azumi, Y., Liu, D., Zhao, D., Li, W., Wang, G., Hu, Y., and Ma, H.** (2002). Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *Embo J* **21**, 3081-3095.
- Badie, S., Liao, C., Thanasoula, M., Barber, P., Hill, M.A., and Tarsounas, M.** (2009). RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation. *J Cell Biol* **185**, 587-600.
- Bae, S.H., Choi, E., Lee, K.H., Park, J.S., Lee, S.H., and Seo, Y.S.** (1998). Dna2 of *Saccharomyces cerevisiae* possesses a single-stranded DNA-specific endonuclease activity that is able to act on double-stranded DNA in the presence of ATP. *J Biol Chem* **273**, 26880-26890.

- Baute, J., and Depicker, A.** (2008). Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**, 239-276.
- Beard, W.A., and Wilson, S.H.** (2006). Structure and mechanism of DNA polymerase Beta. *Chem Rev* **106**, 361-382.
- Bennett, R.J., Noiro-Gros, M.F., and Wang, J.C.** (2000). Interaction between yeast sgs1 helicase and DNA topoisomerase III. *J Biol Chem* **275**, 26898-26905.
- 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**, e132.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., and Forterre, P.** (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**, 414-417.
- Bernstein, K.A., and Rothstein, R.** (2009). At loose ends: resecting a double-strand break. *Cell* **137**, 807-810.
- Bishop, D.K., Ear, U., Bhattacharyya, A., Calderone, C., Beckett, M., Weichselbaum, R.R., and Shinohara, A.** (1998). Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. *J Biol Chem* **273**, 21482-21488.
- Bjergbaek, L., Cobb, J.A., Tsai-Pflugfelder, M., and Gasser, S.M.** (2005). Mechanistically distinct roles for Sgs1p in checkpoint activation and replication fork maintenance. *Embo J* **24**, 405-417.
- Blastyak, A., Pinter, L., Unk, I., Prakash, L., Prakash, S., and Haracska, L.** (2007). Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol Cell* **28**, 167-175.
- Blastyak, A., Hajdu, I., Unk, I., and Haracska, L.** (2010). Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLTF in replication of damaged DNA. *Mol Cell Biol* **30**, 684-693.
- Bleuyard, J.Y., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2004a). Meiotic defects in the Arabidopsis rad50 mutant point to conservation of the MRX complex function in early stages of meiotic recombination. *Chromosoma* **113**, 197-203.
- Bleuyard, J.Y., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2004b). The atspo11-1 mutation rescues atxrcc3 meiotic chromosome fragmentation. *Plant Mol Biol* **56**, 217-224.
- Bleuyard, J.Y., and White, C.I.** (2004c). The Arabidopsis homologue of Xrcc3 plays an essential role in meiosis. *Embo J* **23**, 439-449.
- 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**, 533-545.
- Bleuyard, J.Y., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2006). Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA Repair (Amst)* **5**, 1-12.
- Boddy, M.N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W.D., and Russell, P.** (2000). Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1. *Mol Cell Biol* **20**, 8758-8766.
- Boddy, M.N., Gaillard, P.H., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., 3rd, and Russell, P.** (2001). Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* **107**, 537-548.
- Bonnet, S.** (2009). Neue Ansätze zur Beeinflussung der homologen Rekombination bei Pflanzen. Botanisches Institut II, Karlsruher Institute für Technologie (KIT), (Diplomarbeit).
- Brettel, K., and Byrdin, M.** (2010). Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 693-701.
- Britt, A.** (2002). Repair of damaged bases. *Arabidopsis Book* **1**, e0005.
- Budzowska, M., and Kanaar, R.** (2009). Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell Biochem Biophys* **53**, 17-31.
- Bugreev, D.V., Rossi, M.J., and Mazin, A.V.** (2011). Cooperation of RAD51 and RAD54 in regression of a model replication fork. *Nucleic Acids Res* **39**, 2153-2164.
- Burma, S., Chen, B.P., and Chen, D.J.** (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* **5**, 1042-1048.
- Bussen, W., Raynard, S., Busygina, V., Singh, A.K., and Sung, P.** (2007). Holliday junction processing activity of the BLM-Topo IIIalpha-BLAP75 complex. *J Biol Chem* **282**, 31484-31492.
- 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**, 112-116.

- Cejka, P., Plank, J.L., Bachrati, C.Z., Hickson, I.D., and Kowalczykowski, S.C.** (2012). Rmi1 stimulates decatenation of double Holliday junctions during dissolution by Sgs1-Top3. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1377-1382.
- Chan, S.N., Harris, L., Bolt, E.L., Whitby, M.C., and Lloyd, R.G.** (1997). Sequence specificity and biochemical characterization of the RusA Holliday junction resolvase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**, 14873-14882.
- Chang, M., Bellaoui, M., Zhang, C., Desai, R., Morozov, P., Delgado-Cruzata, L., Rothstein, R., Freyer, G.A., Boone, C., and Brown, G.W.** (2005). RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *Embo J* **24**, 2024-2033.
- 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**, e1000309.
- Chen, C.F., and Brill, S.J.** (2007). Binding and activation of DNA topoisomerase III by the Rmi1 subunit. *J Biol Chem* **282**, 28971-28979.
- Chi, P., San Filippo, J., Sehorn, M.G., Petukhova, G.V., and Sung, P.** (2007). Bipartite stimulatory action of the Hop2-Mnd1 complex on the Rad51 recombinase. *Genes Dev* **21**, 1747-1757.
- Ciccia, A., Constantinou, A., and West, S.C.** (2003). Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *J Biol Chem* **278**, 25172-25178.
- Cloud, V., Chan, Y.L., Grubb, J., Budke, B., and Bishop, D.K.** (2012). Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science* **337**, 1222-1225.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Cobb, J.A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J.A., and Gasser, S.M.** (2005). Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev* **19**, 3055-3069.
- Cobb, J.A., and Bjergbaek, L.** (2006). RecQ helicases: lessons from model organisms. *Nucleic Acids Res* **34**, 4106-4114.
- Constantinou, A., Davies, A.A., and West, S.C.** (2001). Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells. *Cell* **104**, 259-268.
- Copenhaver, G.P., Housworth, E.A., and Stahl, F.W.** (2002). Crossover interference in *Arabidopsis*. *Genetics* **160**, 1631-1639.
- Coulon, S., Gaillard, P.H., Chahwan, C., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, and Russell, P.** (2004). Slx1-Slx4 are subunits of a structure-specific endonuclease that maintains ribosomal DNA in fission yeast. *Mol Biol Cell* **15**, 71-80.
- 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**, 1623-1634.
- Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J., and Mariani, K.J.** (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**, 37-41.
- Critchlow, S.E., and Jackson, S.P.** (1998). DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **23**, 394-398.
- Da Ines, O., Abe, K., Goubely, C., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2012). Differing requirements for RAD51 and DMC1 in meiotic pairing of centromeres and chromosome arms in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **8**, e1002636.
- Davies, A.A., and West, S.C.** (1998). Formation of RuvABC-Holliday junction complexes in vitro. *Curr Biol* **8**, 725-727.
- Daxinger, L., Hunter, B., Sheikh, M., Jauvion, V., Gascioli, V., Vaucheret, H., Matzke, M., and Furner, I.** (2008). Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **13**, 4-6.
- de Felipe, P., Hughes, L.E., Ryan, M.D., and Brown, J.D.** (2003). Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem* **278**, 11441-11448.
- de Felipe, P., and Ryan, M.D.** (2004). Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences. *Traffic* **5**, 616-626.
- de Felipe, P., Luke, G.A., Hughes, L.E., Gani, D., Halpin, C., and Ryan, M.D.** (2006). E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol* **24**, 68-75.

- de Laat, W.L., Jaspers, N.G., and Hoeijmakers, J.H.** (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**, 768-785.
- 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**, 81-94.
- 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**, 4126-4137.
- 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.** (2009). A high throughput genetic screen identifies new early meiotic recombination functions in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **5**, e1000654.
- Deans, A.J., and West, S.C.** (2009). FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Mol Cell* **36**, 943-953.
- Doe, C.L., Ahn, J.S., Dixon, J., and Whitby, M.C.** (2002). Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *J Biol Chem* **277**, 32753-32759.
- 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**, 455-464.
- Donnelly, M.L., Gani, D., Flint, M., Monaghan, S., and Ryan, M.D.** (1997). The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *J Gen Virol* **78 (Pt 1)**, 13-21.
- Doronina, V.A., Wu, C., de Felipe, P., Sachs, M.S., Ryan, M.D., and Brown, J.D.** (2008a). Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon. *Mol Cell Biol* **28**, 4227-4239.
- Doronina, V.A., de Felipe, P., Wu, C., Sharma, P., Sachs, M.S., Ryan, M.D., and Brown, J.D.** (2008b). Dissection of a co-translational nascent chain separation event. *Biochem Soc Trans* **36**, 712-716.
- Dronkert, M.L., Beverloo, H.B., Johnson, R.D., Hoeijmakers, J.H., Jasin, M., and Kanaar, R.** (2000). Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* **20**, 3147-3156.
- Dunderdale, H.J., Benson, F.E., Parsons, C.A., Sharples, G.J., Lloyd, R.G., and West, S.C.** (1991). Formation and resolution of recombination intermediates by *E. coli* RecA and RuvC proteins. *Nature* **354**, 506-510.
- Dunin-Horkawicz, S., Feder, M., and Bujnicki, J.M.** (2006). Phylogenomic analysis of the GIY-YIG nuclease superfamily. *BMC Genomics* **7**, 98.
- Durrant, W.E., Wang, S., and Dong, X.** (2007). *Arabidopsis* SNI1 and RAD51D regulate both gene transcription and DNA recombination during the defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4223-4227.
- Eid, W., Steger, M., El-Shemerly, M., Ferretti, L.P., Pena-Diaz, J., Konig, C., Valtorta, E., Sartori, A.A., and Ferrari, S.** (2010). DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability. *EMBO Rep* **11**, 962-968.
- Ellison, K.S., Dogliotti, E., Connors, T.D., Basu, A.K., and Essigmann, J.M.** (1989). Site-specific mutagenesis by O6-alkylguanines located in the chromosomes of mammalian cells: influence of the mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8620-8624.
- Essen, L.O., and Klar, T.** (2006). Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1266-1277.
- Fanning, E., Klimovich, V., and Nager, A.R.** (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res* **34**, 4126-4137.
- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E.R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M.Q., Ruse, C., Yates, J.R., 3rd, Russell, P., Fuchs, R.P., McGowan, C.H., and Gaillard, P.H.** (2009). Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell* **138**, 78-89.
- 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**, 398-409.
- Francois, I.E.J.A., Van Hemelrijck, W., Aerts, A.M., Wouters, P.F.J., Proost, P., Broekaert, W.F., and Cammue, B.P.A.** (2004). Processing in *Arabidopsis thaliana* of a heterologous polyprotein resulting in differential targeting of the individual plant defensins. *Plant Science* **166**, 113-121.
- Fricke, W.M., Kaliraman, V., and Brill, S.J.** (2001). Mapping the DNA topoisomerase III binding domain of the Sgs1 DNA helicase. *J Biol Chem* **276**, 8848-8855.
- Fricke, W.M., and Brill, S.J.** (2003). Slx1-Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1-Top3. *Genes Dev* **17**, 1768-1778.
- Friedberg, E.C.** (2005). Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 943-953.

- Friedberg, E.C., Lehmann, A.R., and Fuchs, R.P.** (2005). Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell* **18**, 499-505.
- Fromme, J.C., Banerjee, A., and Verdine, G.L.** (2004). DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 43-49.
- Fu, Y., and Xiao, W.** (2003). Functional domains required for the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease complex formation and nuclear localization. *DNA Repair (Amst)* **2**, 1435-1447.
- Fukui, K.** (2010). DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids* **2010**.
- Furukawa, T., Kimura, S., Ishibashi, T., Mori, Y., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K.** (2003). OsSEND-1: a new RAD2 nuclease family member in higher plants. *Plant Mol Biol* **51**, 59-70.
- Gangloff, S., McDonald, J.P., Bendixen, C., Arthur, L., and Rothstein, R.** (1994). The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* **14**, 8391-8398.
- 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**, 1701-1711.
- Gao, H., Chen, X.B., and McGowan, C.H.** (2003). Mus81 endonuclease localizes to nucleoli and to regions of DNA damage in human S-phase cells. *Mol Biol Cell* **14**, 4826-4834.
- Gari, K., Decaillet, C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and Constantinou, A.** (2008). The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks. *Mol Cell* **29**, 141-148.
- 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**, 16107-16112.
- 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**, 1062-1071.
- Giannattasio, M., Follonier, C., Tourriere, H., Puddu, F., Lazzaro, F., Pasero, P., Lopes, M., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M.** (2010). Exo1 competes with repair synthesis, converts NER intermediates to long ssDNA gaps, and promotes checkpoint activation. *Mol Cell* **40**, 50-62.
- Gisler, B., Salomon, S., and Puchta, H.** (2002). The role of double-strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells. *Plant J* **32**, 277-284.
- Goldfarb, T., and Lichten, M.** (2010). Frequent and efficient use of the sister chromatid for DNA double-strand break repair during budding yeast meiosis. *PLoS Biol* **8**, e1000520.
- Gonzalez-Barrera, S., Cortes-Ledesma, F., Wellinger, R.E., and Aguilera, A.** (2003). Equal sister chromatid exchange is a major mechanism of double-strand break repair in yeast. *Mol Cell* **11**, 1661-1671.
- Gorbunova, V., and Levy, A.A.** (1997). Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic Acids Res* **25**, 4650-4657.
- Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., and Jackson, S.P.** (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev* **22**, 2767-2772.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., and Lieber, M.R.** (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**, 492-495.
- Grebenok, R.J., Pierson, E., Lambert, G.M., Gong, F.C., Afonso, C.L., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J.C., and Galbraith, D.W.** (1997). Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant J* **11**, 573-586.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., and Pelletier, G.** (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *Embo J* **20**, 589-600.
- Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F., and Lieber, M.R.** (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *Embo J* **26**, 1010-1023.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., and Maliga, P.** (1994). The small, versatile pZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* **25**, 989-994.
- Halpin, C., Cooke, S.E., Barakate, A., El Amrani, A., and Ryan, M.D.** (1999). Self-processing 2A-polyproteins-- a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants. *Plant J* **17**, 453-459.
- Hanada, K., Budzowska, M., Modesti, M., Maas, A., Wyman, C., Essers, J., and Kanaar, R.** (2006). The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks. *Embo J* **25**, 4921-4932.



- Harfe, B.D., and Jinks-Robertson, S.** (2000). DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* **34**, 359-399.
- Harfe, B.D., and Jinks-Robertson, S.** (2000). Mismatch repair proteins and mitotic genome stability. *Mutat Res* **451**, 151-167.
- Harrison, C.J., Alvey, E., and Henderson, I.R.** (2010). Meiosis in flowering plants and other green organisms. *J Exp Bot* **61**, 2863-2875.
- Hartung, F., and Puchta, H.** (2000). Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **28**, 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**, 81-86.
- Hartung, F., Angelis, K.J., Meister, A., Schubert, I., Melzer, M., and Puchta, H.** (2002). An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Curr Biol* **12**, 1787-1791.
- Hartung, F., 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**, 4438-4448.
- Hartung, F., Wurz-Wildersinn, R., Fuchs, J., Schubert, I., Suer, S., and Puchta, H.** (2007). The catalytically active tyrosine residues of both SPO11-1 and SPO11-2 are required for meiotic double-strand break induction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 3090-3099.
- Hartung, F., Suer, S., and Puchta, H.** (2007). 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**, 18836-18841.
- 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**, e1000285.
- Hefferin, M.L., and Tomkinson, A.E.** (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**, 639-648.
- Hicks, J.K., Chute, C.L., Paulsen, M.T., Ragland, R.L., Howlett, N.G., Gueranger, Q., Glover, T.W., and Canman, C.E.** (2010). Differential roles for DNA polymerases eta, zeta, and REV1 in lesion bypass of intrastrand versus interstrand DNA cross-links. *Mol Cell Biol* **30**, 1217-1230.
- 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**, 2557-2570.
- Higgins, J.D., Buckling, E.F., Franklin, F.C., and Jones, G.H.** (2008). Expression and functional analysis of AtMUS81 in *Arabidopsis* meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *Plant J* **54**, 152-162.
- Higgins, J.D., Vignard, J., Mercier, R., Pugh, A.G., Franklin, F.C., and Jones, G.H.** (2008). AtMSH5 partners AtMSH4 in the class I meiotic crossover pathway in *Arabidopsis thaliana*, but is not required for synapsis. *Plant J* **55**, 28-39.
- 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**, 492-502.
- Hillers, K.J.** (2004). Crossover interference. *Curr Biol* **14**, R1036-1037.
- Ho, T.V., and Scharer, O.D.** (2010). Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. *Environ Mol Mutagen* **51**, 552-566.
- Hoadley, K.A., Xue, Y., Ling, C., Takata, M., Wang, W., and Keck, J.L.** (2012). Defining the molecular interface that connects the Fanconi anemia protein FANCM to the Bloom syndrome dissolvasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4437-4442.
- Holliday, R.** (1964). The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* **50**, 323-335.
- Holloway, J.K., Booth, J., Edelmann, W., McGowan, C.H., and Cohen, P.E.** (2008). MUS81 generates a subset of MLH1-MLH3-independent crossovers in mammalian meiosis. *PLoS Genet* **4**, e1000186.
- Hu, P., Beresten, S.F., van Brabant, A.J., Ye, T.Z., Pandolfi, P.P., Johnson, F.B., Guarente, L., and Ellis, N.A.** (2001). Evidence for BLM and Topoisomerase IIIalpha interaction in genomic stability. *Hum Mol Genet* **10**, 1287-1298.

- Hunter, N., and Kleckner, N.** (2001). The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* **106**, 59-70.
- Inbar, O., and Kupiec, M.** (1999). Homology search and choice of homologous partner during mitotic recombination. *Mol Cell Biol* **19**, 4134-4142.
- Inbar, O., Liefshitz, B., Bitan, G., and Kupiec, M.** (2000). The relationship between homology length and crossing over during the repair of a broken chromosome. *J Biol Chem* **275**, 30833-30838.
- Interthal, H., and Heyer, W.D.** (2000). MUS81 encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **263**, 812-827.
- Ip, S.C., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M., and West, S.C.** (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* **456**, 357-361.
- Ishikawa, G., Kanai, Y., Takata, K., Takeuchi, R., Shimanouchi, K., Ruike, T., Furukawa, T., Kimura, S., and Sakaguchi, K.** (2004). DmGEN, a novel RAD2 family endo-exonuclease from *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **32**, 6251-6259.
- Iwasaki, H., Shiba, T., Makino, K., Nakata, A., and Shinagawa, H.** (1989). Overproduction, purification, and ATPase activity of the *Escherichia coli* RuvB protein involved in DNA repair. *J Bacteriol* **171**, 5276-5280.
- Iwasaki, H., Shiba, T., Nakata, A., and Shinagawa, H.** (1989). Involvement in DNA repair of the *ruvA* gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **219**, 328-331.
- Iwasaki, H., Takahagi, M., Shiba, T., Nakata, A., and Shinagawa, H.** (1991). *Escherichia coli* RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure. *Embo J* **10**, 4381-4389.
- Jansen, M.A.K., Gaba, V., and Greenberg, B.M.** (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* **3**, 131-135.
- Jones, G.H., and Franklin, F.C.** (2006). Meiotic crossing-over: obligation and interference. *Cell* **126**, 246-248.
- Kadyk, L.C., and Hartwell, L.H.** (1992). Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **132**, 387-402.
- Karimi, M., Bleys, A., Vanderhaeghen, R., and Hilson, P.** (2007). Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol* **145**, 1183-1191.
- Kazda, A., Zellinger, B., Rosler, M., Derboven, E., Kusenda, B., and Riha, K.** (2012). Chromosome end protection by blunt-ended telomeres. *Genes Dev* **26**, 1703-1713.
- 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**, 375-384.
- Keeney, S.** (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* **52**, 1-53.
- 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**, 2486-2496.
- Khakhar, R.R., Cobb, J.A., Bjergbaek, L., Hickson, I.D., and Gasser, S.M.** (2003). RecQ helicases: multiple roles in genome maintenance. *Trends Cell Biol* **13**, 493-501.
- Khanna, K.K., and Jackson, S.P.** (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**, 247-254.
- Khare, V., and Eckert, K.A.** (2002). The proofreading 3'→5' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis. *Mutat Res* **510**, 45-54.
- Kielbassa, C., Roza, L., and Epe, B.** (1997). Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* **18**, 811-816.
- Kirik, A., Salomon, S., and Puchta, H.** (2000). Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants. *Embo J* **19**, 5562-5566.
- Kleckner, N.** (2006). Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma* **115**, 175-194.
- Klimesch, J.** (2012). Untersuchungen zur somatischen homologen Doppelstrangbruch-Reparatur in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*. . Botanisches Institut II, Karlsruher Institute für Technologie (KIT), (Doktorarbeit).
- Klimyuk, V.I., and Jones, J.D.** (1997). AtDMC1, the *Arabidopsis* homologue of the yeast DMC1 gene: characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression. *Plant J* **11**, 1-14.

- Knoll, A.** (2007). Etablierung und Anwendung molekulargenetischer Methoden zur Charakterisierung von RecQ-Helikasen und ihren Interaktionspartnern in *Arabidopsis thaliana*. Botanisches Institut II, Karlsruher Institute für Technologie (KIT), (Diplomarbeit).
- Knoll, A.** (2011). Rolle der DNA-Helikasen FANCM, SRS2 und RTEL1 in der somatischen und meiotischen homologen Rekombination von *Arabidopsis thaliana*. Botanisches Institut II, Karlsruher Institute für Technologie (KIT), (Doktorarbeit).
- Knoll, A., Higgins, J.D., Seeliger, K., Reha, S.J., Dangel, N.J., Bauknecht, M., Schropfer, S., Franklin, F.C., and Puchta, H.** (2012). The Fanconi anemia ortholog FANCM ensures ordered homologous recombination in both somatic and meiotic cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 1448-1464.
- Koncz, C., and Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* **MGG 204**, 383-396.
- Kunkel, T.A., and Bebenek, K.** (2000). DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* **69**, 497-529.
- Kunkel, T.A.** (2004). DNA replication fidelity. *J Biol Chem* **279**, 16895-16898.
- Kunkel, T.A., and Erie, D.A.** (2005). DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74**, 681-710.
- Kurzbauer, M.T., Uanschou, C., Chen, D., and Schlogelhofer, P.** (2012). The recombinases DMC1 and RAD51 are functionally and spatially separated during meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 2058-2070.
- Lagerwerf, S., Vrouwe, M.G., Overmeer, R.M., Fousteri, M.I., and Mullenders, L.H.** (2011). DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst)* **10**, 743-750.
- Langerak, P., and Russell, P.** (2011). Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**, 3562-3571.
- Lee, S.K., Johnson, R.E., Yu, S.L., Prakash, L., and Prakash, S.** (1999). Requirement of yeast SGS1 and SRS2 genes for replication and transcription. *Science* **286**, 2339-2342.
- Lehmann, A.R.** (2005). Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett* **579**, 873-876.
- 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**, 965-976.
- Li, X., and Heyer, W.D.** (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**, 99-113.
- Lieber, M.R., Grawunder, U., Wu, X., and Yaneva, M.** (1997). Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 99-104.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K.** (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 712-720.
- Lieber, M.R., Gu, J., Lu, H., Shimazaki, N., and Tsai, A.G.** (2010). Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem* **50**, 279-296.
- Lieberman-Lazarovich, M., and Levy, A.A.** (2011). Homologous recombination in plants: an antireview. *Methods Mol Biol* **701**, 51-65.
- Lilley, D.M., and White, M.F.** (2001). The junction-resolving enzymes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 433-443.
- Lindahl, T., and Wood, R.D.** (1999). Quality control by DNA repair. *Science* **286**, 1897-1905.
- Lippke, J.A., Gordon, L.K., Brash, D.E., and Haseltine, W.A.** (1981). Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3388-3392.
- Liu, N., Schild, D., Thelen, M.P., and Thompson, L.H.** (2002). Involvement of Rad51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells. *Nucleic Acids Res* **30**, 1009-1015.
- Liu, Y., Prasad, R., Beard, W.A., Kedar, P.S., Hou, E.W., Shock, D.D., and Wilson, S.H.** (2007). Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta. *J Biol Chem* **282**, 13532-13541.
- Lu, A.L., Li, X., Gu, Y., Wright, P.M., and Chang, D.Y.** (2001). Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys* **35**, 141-170.
- Luke, G., Escuin, H., De Felipe, P., and Ryan, M.** (2010). 2A to the fore - research, technology and applications. *Biotechnol Genet Eng Rev* **26**, 223-260.

- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R.** (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**, 781-794.
- Mahdi, A.A., Sharples, G.J., Mandal, T.N., and Lloyd, R.G.** (1996). Holliday junction resolvases encoded by homologous *rusA* genes in *Escherichia coli* K-12 and phage 82. *J Mol Biol* **257**, 561-573.
- Mandal, T.N., Mahdi, A.A., Sharples, G.J., and Lloyd, R.G.** (1993). Resolution of Holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of *ruvA*, *ruvB*, and *ruvC* mutations. *J Bacteriol* **175**, 4325-4334.
- Mankouri, H.W., and Hickson, I.D.** (2007). The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'? *Trends Biochem Sci* **32**, 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**, 3318-3330.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D., and Bryant, S.H.** (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* **35**, D237-240.
- Masson, J.Y., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Benson, F.E., and West, S.C.** (2001). Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8440-8446.
- Mazloum, N., and Holloman, W.K.** (2009). Brh2 promotes a template-switching reaction enabling recombinational bypass of lesions during DNA synthesis. *Mol Cell* **36**, 620-630.
- McGlynn, P., and Lloyd, R.G.** (2002). Replicating past lesions in DNA. *Mol Cell* **10**, 700-701.
- McPherson, J.P., Lemmers, B., Chahwan, R., Pamidi, A., Migon, E., Matysiak-Zablocki, E., Moynahan, M.E., Essers, J., Hanada, K., Poonepalli, A., Sanchez-Sweatman, O., Khokha, R., Kanaar, R., Jasin, M., Hande, M.P., and Hakem, R.** (2004). Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression. *Science* **304**, 1822-1826.
- McVey, M., and Lee, S.E.** (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet* **24**, 529-538.
- Meetei, A.R., Sechi, S., Wallisch, M., Yang, D., Young, M.K., Joenje, H., Hoatlin, M.E., and Wang, W.** (2003). A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol* **23**, 3417-3426.
- Meetei, 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**, 958-963.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S.** (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770-774.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S.** (2009). DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* **8**, 983-995.
- Mimori, T., and Hardin, J.A.** (1986). Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* **261**, 10375-10379.
- Mitchell, D.L., Jen, J., and Cleaver, J.E.** (1991). Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol* **54**, 741-746.
- Mithofer, A., Schulze, B., and Boland, W.** (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Lett* **566**, 1-5.
- Miyajima, A., Seki, M., Onoda, F., Shiratori, M., Odagiri, N., Ohta, K., Kikuchi, Y., Ohno, Y., and Enomoto, T.** (2000). Sgs1 helicase activity is required for mitotic but apparently not for meiotic functions. *Mol Cell Biol* **20**, 6399-6409.
- Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffler, S., and Hohn, B.** (2004). Interchromatid and interhomolog recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 342-352.

- Moritoh, S., Miki, D., Akiyama, M., Kawahara, M., Izawa, T., Maki, H., and Shimamoto, K.** (2005). RNAi-mediated silencing of OsGEN-L (OsGEN-like), a new member of the RAD2/XPG nuclease family, causes male sterility by defect of microspore development in rice. *Plant Cell Physiol* **46**, 699-715.
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., and de Villartay, J.P.** (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* **105**, 177-186.
- Mu, D., and Sancar, A.** (1997). DNA excision repair assays. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **56**, 63-81.
- Mullen, J.R., Kaliraman, V., Ibrahim, S.S., and Brill, S.J.** (2001). Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**, 103-118.
- Munoz, I.M., Hain, K., Declais, A.C., Gardiner, M., Toh, G.W., Sanchez-Pulido, L., Heuckmann, J.M., Toth, R., Macartney, T., Eppink, B., Kanaar, R., Ponting, C.P., Lilley, D.M., and Rouse, J.** (2009). Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair. *Mol Cell* **35**, 116-127.
- 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**, 1613-1625.
- Neale, M.J., Pan, J., and Keeney, S.** (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* **436**, 1053-1057.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C.** (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* **391**, 407-410.
- Nimonkar, A.V., Ozsoy, A.Z., Genschel, J., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C.** (2008). Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16906-16911.
- Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C.** (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev* **25**, 350-362.
- Nishant, K.T., Chen, C., Shinohara, M., Shinohara, A., and Alani, E.** (2010). Genetic analysis of baker's yeast Msh4-Msh5 reveals a threshold crossover level for meiotic viability. *PLoS Genet* **6**.
- Nishino, T., Ariyoshi, M., Iwasaki, H., Shinagawa, H., and Morikawa, K.** (1998). Functional analyses of the domain structure in the Holliday junction binding protein RuvA. *Structure* **6**, 11-21.
- Novarina, D., Amara, F., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M.** (2011). Mind the gap: keeping UV lesions in check. *DNA Repair (Amst)* **10**, 751-759.
- Odagiri, N., Seki, M., Onoda, F., Yoshimura, A., Watanabe, S., and Enomoto, T.** (2003). Budding yeast *mms4* is epistatic with *rad52* and the function of *Mms4* can be replaced by a bacterial Holliday junction resolvase. *DNA Repair (Amst)* **2**, 347-358.
- Onodera, R., Seki, M., Ui, A., Satoh, Y., Miyajima, A., Onoda, F., and Enomoto, T.** (2002). Functional and physical interaction between Sgs1 and Top3 and Sgs1-independent function of Top3 in DNA recombination repair. *Genes Genet Syst* **77**, 11-21.
- 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**, 71-81.
- 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**, 819-833.
- Osman, F., Dixon, J., Doe, C.L., and Whitby, M.C.** (2003). Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol Cell* **12**, 761-774.
- Osman, F., Gaskell, L., and Whitby, M.C.** (2009). Efficient second strand cleavage during Holliday junction resolution by RuvC requires both increased junction flexibility and an exposed 5' phosphate. *PLoS One* **4**, e5347.
- 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**, 523-544.

- Otsuji, N., Iyehara, H., and Hideshima, Y. (1974). Isolation and characterization of an *Escherichia coli* ruv mutant which forms nonseptate filaments after low doses of ultraviolet light irradiation. *J Bacteriol* **117**, 337-344.
- Pacher, M., Schmidt-Puchta, W., and Puchta, H. (2007). Two unlinked double-strand breaks can induce reciprocal exchanges in plant genomes via homologous recombination and nonhomologous end joining. *Genetics* **175**, 21-29.
- 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.
- 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.
- Pezza, R.J., Voloshin, O.N., Vanevski, F., and Camerini-Otero, R.D. (2007). Hop2/Mnd1 acts on two critical steps in Dmc1-promoted homologous pairing. *Genes Dev* **21**, 1758-1766.
- Prabu, J.R., Thamocharan, S., Khanduja, J.S., Alipio, E.Z., Kim, C.Y., Waldo, G.S., Terwilliger, T.C., Segelke, B., Lekin, T., Toppani, D., Hung, L.W., Yu, M., Bursley, E., Muniyappa, K., Chandra, N.R., and Vijayan, M. (2006). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* RuvA, a protein involved in recombination. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**, 731-734.
- Prakash, S., Johnson, R.E., and Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem* **74**, 317-353.
- Pringle, F.M., Gordon, K.H., Hanzlik, T.N., Kalkmakoff, J., Scotti, P.D., and Ward, V.K. (1999). A novel capsid expression strategy for *Thosea asigna* virus (Tetraviridae). *J Gen Virol* **80 ( Pt 7)**, 1855-1863.
- Puchta, H. (1999). Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics* **152**, 1173-1181.
- Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* **56**, 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**, 1968-1978.
- Putnam, C.D., Clancy, S.B., Tsuruta, H., Gonzalez, S., Wetmur, J.G., and Tainer, J.A. (2001). Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J Mol Biol* **311**, 297-310.
- Rass, U., Compton, S.A., Matos, J., Singleton, M.R., Ip, S.C., Blanco, M.G., Griffith, J.D., and West, S.C. (2010). Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes Dev* **24**, 1559-1569.
- Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J Biol Chem* **281**, 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**, 15701-15708.
- Reardon, J.T., and Sancar, A. (2005). Nucleotide excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **79**, 183-235.
- Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H.K., and Hohn, B. (2000). Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* **406**, 98-101.
- Ross-Macdonald, P., and Roeder, G.S. (1994). Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell* **79**, 1069-1080.
- Ryan, M.D., and Drew, J. (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *Embo J* **13**, 928-933.
- Ryan, M.D., and Flint, M. (1997). Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol* **78 ( Pt 4)**, 699-723.
- Saito, T.T., Youds, J.L., Boulton, S.J., and Colaiacovo, M.P. (2009). *Caenorhabditis elegans* HIM-18/SLX-4 interacts with SLX-1 and XPF-1 and maintains genomic integrity in the germline by processing recombination intermediates. *PLoS Genet* **5**, e1000735.
- Saito, T.T., Mohideen, F., Meyer, K., Harper, J.W., and Colaiacovo, M.P. (2012). SLX-1 is required for maintaining genomic integrity and promoting meiotic noncrossovers in the *Caenorhabditis elegans* germline. *PLoS Genet* **8**, e1002888.

- Salomon, S., and Puchta, H.** (1998). Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *Embo J* **17**, 6086-6095.
- Sancar, A., and Rupp, W.D.** (1983). A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell* **33**, 249-260.
- Sancar, A.** (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* **103**, 2203-2237.
- Sancar, A., and Reardon, J.T.** (2004). Nucleotide excision repair in *E. coli* and man. *Adv Protein Chem* **69**, 43-71.
- 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**, 2220-2233.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D., and Lohmann, J.U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**, 501-506.
- Schröpfer, S.** (2012). Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion von RecQ-Helikasen und RMI2 aus *Arabidopsis thaliana* in der DNA-Reparatur und -Rekombination. Botanisches Institut II, Karlsruher Institute für Technologie (KIT), (Doktorarbeit).
- Schwartz, E.K., and Heyer, W.D.** (2011). Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* **120**, 109-127.
- Shah, R., Cosstick, R., and West, S.C.** (1997). The RuvC protein dimer resolves Holliday junctions by a dual incision mechanism that involves base-specific contacts. *Embo J* **16**, 1464-1472.
- Shalev, G., and Levy, A.A.** (1997). The maize transposable element *Ac* induces recombination between the donor site and an homologous ectopic sequence. *Genetics* **146**, 1143-1151.
- Sharples, G.J., Chan, S.N., Mahdi, A.A., Whitby, M.C., and Lloyd, R.G.** (1994). Processing of intermediates in recombination and DNA repair: identification of a new endonuclease that specifically cleaves Holliday junctions. *Embo J* **13**, 6133-6142.
- Sharples, G.J., Whitby, M.C., Ryder, L., and Lloyd, R.G.** (1994). A mutation in helicase motif III of *E. coli* RecG protein abolishes branch migration of Holliday junctions. *Nucleic Acids Res* **22**, 308-313.
- Sharples, G.J., Ingleston, S.M., and Lloyd, R.G.** (1999). Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RuvA. *J Bacteriol* **181**, 5543-5550.
- Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T.** (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* **69**, 457-470.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A.** (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18**, 134-147.
- Shuman, S., and Glickman, M.S.** (2007). Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol* **5**, 852-861.
- 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**, 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**, 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**, 2856-2868.
- Smider, V., and Chu, G.** (1997). The end-joining reaction in V(D)J recombination. *Semin Immunol* **9**, 189-197.
- Sommergruber, W., Zorn, M., Blaas, D., Fessl, F., Volkmann, P., Maurer-Fogy, I., Pallai, P., Merluzzi, V., Matteo, M., Skern, T., and et al.** (1989). Polypeptide 2A of human rhinovirus type 2: identification as a protease and characterization by mutational analysis. *Virology* **169**, 68-77.
- 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**, 206-216.
- Staresincic, L., Fagbemi, A.F., Enzlin, J.H., Gourdin, A.M., Wijgers, N., Dunand-Sauthier, I., Giglia-Mari, G., Clarkson, S.G., Vermeulen, W., and Scharer, O.D.** (2009). Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *Embo J* **28**, 1111-1120.

- Suer, S.** (2008). Der RTR-Komplex in *Arabidopsis thaliana* – molekulare Charakterisierung von DNA-Reparaturmutanten. In Botanisches Institut II, Universität Karlsruhe, (Doktorarbeit).
- 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**, 5539-5548.
- Sung, P.** (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* **265**, 1241-1243.
- Sung, P.** (1997). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem* **272**, 28194-28197.
- Sutherland, M.W.** (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**, 79-93.
- Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O'Connell, B.C., Gygi, S.P., Elledge, S.J., and Harper, J.W.** (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell* **138**, 63-77.
- Symington, L.S.** (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 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**, 25-35.
- 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**, 87-93.
- Thacker, J.** (1999). The role of homologous recombination processes in the repair of severe forms of DNA damage in mammalian cells. *Biochimie* **81**, 77-85.
- Thaler, D.S., and Stahl, F.W.** (1988). DNA double-chain breaks in recombination of phage lambda and of yeast. *Annu Rev Genet* **22**, 169-197.
- Thompson, C.L., and Sancar, A.** (2002). Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene* **21**, 9043-9056.
- Toyoda, H., Nicklin, M.J., Murray, M.G., Anderson, C.W., Dunn, J.J., Studier, F.W., and Wimmer, E.** (1986). A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell* **45**, 761-770.
- Tsaneva, I.R., Muller, B., and West, S.C.** (1993). RuvA and RuvB proteins of *Escherichia coli* exhibit DNA helicase activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1315-1319.
- Tsubouchi, H., and Roeder, G.S.** (2002). The Mnd1 protein forms a complex with hop2 to promote homologous chromosome pairing and meiotic double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22**, 3078-3088.
- 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**, 134-149.
- 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**, 5061-5070.
- Ui, A., Satoh, Y., Onoda, F., Miyajima, A., Seki, M., and Enomoto, T.** (2001). The N-terminal region of Sgs1, which interacts with Top3, is required for complementation of MMS sensitivity and suppression of hyper-recombination in *sgs1* disruptants. *Mol Genet Genomics* **265**, 837-850.
- Unk, I., Hajdu, I., Blastyak, A., and Haracska, L.** (2010). Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTF and SHPRH in DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)* **9**, 257-267.
- van Gool, A.J., Hajibagheri, N.M., Stasiak, A., and West, S.C.** (1999). Assembly of the *Escherichia coli* RuvABC resolvosome directs the orientation of holliday junction resolution. *Genes Dev* **13**, 1861-1870.
- van Heemst, D., Brugmans, L., Verkaik, N.S., and van Gent, D.C.** (2004). End-joining of blunt DNA double-strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA-PK and XRCC4. *DNA Repair (Amst)* **3**, 43-50.
- Van Houten, B., and Snowden, A.** (1993). Mechanism of action of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease: clues to the damage recognition problem. *Bioessays* **15**, 51-59.
- Varshavsky, A.** (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* **2**, 13-28.



- Vignard, J., Siwec, 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**, 1894-1906.
- Walbot, V.** (1985). On the life strategies of plants and animals. *Trends in Genetics* **1**, 165-169.
- Wang, F., Yang, Y., Singh, T.R., Busygina, V., Guo, R., Wan, K., Wang, W., Sung, P., Meetei, A.R., and Lei, M.** (2010). Crystal structures of RMI1 and RMI2, two OB-fold regulatory subunits of the BLM complex. *Structure* **18**, 1159-1170.
- Waterworth, W.M., Jiang, Q., West, C.E., Nikaido, M., and Bray, C.M.** (2002). Characterization of *Arabidopsis* photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *J Exp Bot* **53**, 1005-1015.
- 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**, 41-52.
- Watt, P.M., Louis, E.J., Borts, R.H., and Hickson, I.D.** (1995). Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II *in vivo* and is required for faithful chromosome segregation. *Cell* **81**, 253-260.
- Whitby, M.C.** (2005). Making crossovers during meiosis. *Biochem Soc Trans* **33**, 1451-1455.
- Wu, L., Davies, S.L., North, P.S., Goulaouic, H., Riou, J.F., Turley, H., Gatter, K.C., and Hickson, I.D.** (2000). The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J Biol Chem* **275**, 9636-9644.
- Wu, L., and Hickson, I.D.** (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**, 870-874.
- Wu, L., Chan, K.L., Ralf, C., Bernstein, D.A., Garcia, P.L., Bohr, V.A., Vindigni, A., Janscak, P., Keck, J.L., and Hickson, I.D.** (2005). The HRDC domain of BLM is required for the dissolution of double Holliday junctions. *Embo J* **24**, 2679-2687.
- Wu, Y., Sugiyama, T., and Kowalczykowski, S.C.** (2006). DNA annealing mediated by Rad52 and Rad59 proteins. *J Biol Chem* **281**, 15441-15449.
- Wu, L., Bachrati, C.Z., Ou, J., Xu, C., Yin, J., Chang, M., Wang, W., Li, L., Brown, G.W., and Hickson, I.D.** (2006). BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4068-4073.
- 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**, 2843-2855.
- Yang, J., O'Donnell, L., Durocher, D., and Brown, G.W.** (2012). RMI1 promotes DNA replication fork progression and recovery from replication fork stress. *Mol Cell Biol* **32**, 3054-3064.
- Yin, J., Sobeck, A., Xu, C., Meetei, A.R., Hoatlin, M., Li, L., and Wang, W.** (2005). BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity. *Embo J* **24**, 1465-1476.
- Yonetani, Y., Hoegger, H., Sonoda, E., Shinya, S., Yoshikawa, H., Takeda, S., and Yamazoe, M.** (2005). Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* **33**, 4544-4552.
- Zakharyevich, K., Ma, Y., Tang, S., Hwang, P.Y., Boiteux, S., and Hunter, N.** (2010). Temporally and biochemically distinct activities of Exo1 during meiosis: double-strand break resection and resolution of double Holliday junctions. *Mol Cell* **40**, 1001-1015.
- Zhang, S., Du, H., and Klessig, D.F.** (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* **10**, 435-450.
- Zhang, F., Maeder, M.L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J.P., Reyon, D., Christian, M., Li, X., Pierick, C.J., Dobbs, D., Peterson, T., Joung, J.K., and Voytas, D.F.** (2010). High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12028-12033.
- Zhu, Z., Chung, W.H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G.** (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**, 981-994.

## 6 Anhang

### 6.1 verwendete Primer

**Tabelle 6.1: Primer zur Genotypisierung.** Die aufgelisteten Primer wurden zur Genotypisierung der verwendeten T-DNA-Insertionsmutanten bzw. Deletionsmutante benutzt. Angegeben sind die Primerkombinationen, welche zum Nachweis des WT-Alles bzw. der Mutation dienen.

Linie	PCR	Primer	Primersequenz (5'-3')	Produkt	Temp.
<b>IC9C</b>	WT	IC9C-FW neu IC9C-R	GAAGAACCTACCTGGTCTGT CCAGAAAGTAAAAGTGAAGTTC	750 bp	56 °C
	T-DNA	IC9C-FW neu LB1	GAAGAACCTACCTGGTCTGT GACCATCATACTCATTGCTG	750 bp	56 °C
<b>mus81-1</b>	WT	MUS81-1 MUS? R2	AGTGAATCTGATAGTGAGTG GCAGCATCAATAAGCTCTTG	600 bp	56 °C
	T-DNA	LB1 MUS? R2	GACCATCATACTCATTGCTG GCAGCATCAATAAGCTCTTG	650 bp	56 °C
<b>rmi1-1</b>	WT	RMI1-IN1-FW RMI1-IN1-REV	AACCGGAAACCTCAGTATC AACAAACGGACCAGCGAG	420 bp	56 °C
	Deletion	RMI1-IN1-FW RMI1-IN2-REV	AACCGGAAACCTCAGTATC AGAAGCTCATACTAGACTG	620 bp	56 °C
<b>rmi1-1</b>	WT	RMI1-G-FW RMI1-G-REV	ATGTGTGATTTTGGCTGAAC CTAAACGAGTACATTGTCAG	750 bp	54 °C
	Deletion	RMI1-IN1-FW RMI1-Int-REV	AACCGGAAACCTCAGTATC CATTGATTGAAGACTGAGAGTG	550 bp	54°C
<b>rmi1-2</b>	WT	RMI1-IN2-FW RMI1-IN2-REV	TTCACCATAGCCGAGTTAC AGAAGCTCATACTAGACTG	825 bp	56 °C
	T-DNA	RMI1-IN2-FW LBd1	TTCACCATAGCCGAGTTAC TCGGAACCACCATCAAACAG	775 bp	56°C

**Tabelle 6.2 Klonierungsprimer für RMI1-Komplementationskonstrukte.** Die aufgelisteten Primer wurden zur Klonierung der RMI1-Komplementationskonstrukte benutzt. Die notwendigen Homologien für die In-Fusion® Klonierung wurden mittels Überhangprimern angefügt und sind in rot dargestellt.

Primer	Primersequenz (5'-3')
RMI1_Prom-rev (0)	TTCTTCGCCGCGAAATTTAG
RMI1_Prom-fw (0)	GTGCCAACCAGCCAAGATTG
RMI1_Term-rev (0)	CGTGTCTTATTTGGTCGAGTC
RMI1_Term-fw+TGA	TGATCCAGTACTCAACTAAAAG
RMI1-fw ATG	ATGCGTAGACGGCGCCTG
RMI1-fw 1	AATGCTAATGCAGGGCTTAAG
RMI1-fw 2	GGAGGGATGGTTGAAGAACTA
RMI1-fw 3	GATAGGACATTCATCCATGG
RMI1-rev 1	TTTCTCTGTATTTGTAGACAGC
RMI1-rev 1b	CATCCATCGCCCGTGAAC
RMI1-rev 2	ACCAGCAGGAGCCAAGACTT
RMI1-rev 3	GATCGGCGATTCATAGTCATTG
RMI1-rev 4	AATACCAAAGCTCTGAACAG
pSBO_RMI1_Prom-fw	ACGCGTCCATGGTTAATTAAGTGCCAACCAGCCAAGATTG
pSBO_RMI1_Term-rev	GGTCCGGACGTCTTAATTAACGTGTCTTATTTGGTCGAGTC
RMI1_Prom-rev	GCAGGCGCCGTCTACGCATTTCTTCGCCGCGAAATTTAG
Prom_RMI1-fw	CTAAATTTGCCGCGCAAGAAATGCGTAGACGGCGCCTG
nDUF_vDUF-rev	TAAGCCCTGCATTAGCATTGATCGGCGATTCATAGTCATTG
vDUF_nDUF-fw	GACTATGAATCGCCGATCAATGCTAATGCAGGGCTTAAG
nOB1_vOB1-rev	GTTCTTCAACCATCCCTCCACCAGCAGGAGCCAAGAC
vOB1_nOB1-fw	GTCTTGGCTCCTGCTGGTGGAGGGATGGTTGAAGAACTA
Term_vOB2-rev	TAGTTGAGTACTGGATCATTTCTCTGTATTTGTAGACAGC
vOB2_Term-fw	GTCTACAAATACAGAGAAATGATCCAGTACTCAACTAAAAG

**Tabelle 6.3 Klonierungsprimer für Resolvasen-Konstrukte.** Die aufgelisteten Primer wurden zur der Klonierung der Resolvasen-Konstrukte benutzt. Die notwendigen Homologien für die In-Fusion® Klonierung mittels Überhangprimern angefügt wurden sind in blau dargestellt. Für die Klonierung angefügte Schnittstellen sind grün markiert. Die Sequenzen der Homing Endonuklease sind rot dargestellt. Es sind ebenfalls die Oligonukleotide aufgeführt, welche die NLS (rosa) und die T2A-Sequenz (orange) zur Klonierung der bakteriellen Konstrukte enthalten.

Primer	Primersequenz (5'-3')
RMI2-Pro-fw	ATCAGCCCAAATCCTACCAC
RMI2-Pro-rev	TTTACCCGCCGATCCGACT
RMI2-ISceI-fw	GATAGGCGCGCTAGGGATAACAGGGTAATATCAGCCCAAATCCTACCAC
RMI2-ISceI-rev	GATACCTCAGGTAGGGATAACAGGGTAATTTTACCCGCCGATCCGACT
RMI2-Pro-fw AatII	GATAGACGTCATCAGCCCAAATCCTACCAC
RMI2-Pro-rev AatII	GATAGACGCTTTTACCCGCCGATCCGACT
RMI2-Pi-PspI-fw	GATAGACGCTGGCAAACAGCTATTATGGGTATTATGGGTATCAGCCCAAATCCTACCAC
RMI2-Pi-PspI-rev	GATAGACGTCCTAGGTGGCAAACAGCTATTATGGGTATTATGGGTTTTACCCGCCGATCCGACT
DMC1-fw	GTGAAGTGCTCTTAAAGTTATAAC
DMC1-rev	CACTTCTTCTGTAGAGGTTTCTT

Tabelle 6.3: Fortsetzung

DMC1-IScel-fw	GATAGGCGCGCCTAGGGATAACAGGGTAATGTGAAGTGCTCTTAAAGTTATAAC
DMC1-IScel-rev	GATACCTCAGGTAGGGATAACAGGGTAATCACTTCTTCTGTAGAGGTTTCTT
DMC1-Pi-Pspl-fw	GATAGACGCTGGCAAACAGCTATTATGGGTATTATGGGTGTGAAGTGCTCTTAAAGTTATAAC
DMC1--Pi-Pspl-rev	GATAGACGCTCCCTAGGTGGCAAACAGCTATTATGGGTATTATGGGTCACTTCTTCTGTAGAGGTTTCTT
DMC1-Pi-Pspl-fw1	TATGGGTATTATGGGTGTGAAGTGCTCTTAAAGTTATAAC
DMC1-Pi-Pspl-fw2	GATAGACGCTGGCAAACAGCTATTATGGGTATTATGGGTGTGAAG
DMC1-Pi-Pspl-rev 1	TATTATGGGTATTATGGGTCACTTCTTCTGTAGAGGTTTCTT
DMC1-Pi-Pspl-rev 2	GATAGACGCTCCCTAGGTGGCAAACAGCTATTATGGGTATTATGGGTCACTTC
Terminator fw	CCATGCCCGCTGAAATCAC
Terminator rev	CTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAG
Inf-T1-rev	AGACGTCTTAATTAACCATGGCTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAG
Inf-T2-rev	AGAGGATCCACTAGTCGGTCCGCTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAG
GEN1-fw (0)	ATGGGTGTGGGAGGCAAT
GEN1-rev (0)	CTATCCAAACAAGAGACGAC
Inf-GEN1-fw	TACCTGAGGACGCGTCCATGGATGGGTGTGGGAGGCAAT
Inf-GEN1(T1)-rev	GCGGGCATGGCTATCCAAACAAGAGACGAC
Inf-(GEN1)T1-fw	GTTTGGATAGCCATGCCCGCTGAAATCAC
MUS81-fw (0)	ATGGATGACGAGAGACGGG
MUS81-rev(0)	TCATTCACCCCAAATAACTTG
Inf-(MUS)-T1-fw	GGGTGAATGACCATGCCCGCTGAAATCAC
Inf-MUS-fw	ACCCTGTTATCCCTACCTGAGGATGGATGACGAGAGACGGG
Inf-(MUS)-T1-rev	GCGGGCATGGTCAATTCACCCCAAATAACTTG
EME1A fw (0)	ATGAGCGATTTTCAATTTGATCTCC
EME1A rev (0)	CTAAATTAAGTCAGATGGAGGAAG
Inf-EME-fw	AATAGCTGTTTGCCACCTAGGATGAGCGATTTTCAATTTGATCTCC
Inf-EME-(T2)rev	GCGGGCATGGCTAAATTAAGTCAGATGGAGGAAG
Inf-(EME)-T2-fw	CTTAATTTAGCCATGCCCGCTGAAATCAC
SLX1 fw (0)	ATGTCGCAGAAAATACAGCAG
SLX1 rev (0)	CTACTTCCCGTGAGCTAAC
Inf-SLX1-fw	ACCCTGTTATCCCTACCTGAGGATGTCGCAGAAAATACAGCAG
Inf-SLX1(T1)-rev	GCGGGCATGGCTACTTCCCGTGAGCTAAC
Inf-(SLX1)T1-fw	CGGGAAGTAGCCATGCCCGCTGAAATCAC
SLX4 fw (0)n	ATGGAACCTCAGAGGGCACAACG
SLX4 rev (0)n	CTACTTTTTATCGTTTCTCAGACATATTCCTTG
Inf-SLX4-fw	AATAGCTGTTTGCCACCTAGGATGGAACCTCAGAGGGCACAACG
Inf-SLX4(T2)-rev	GCGGGCATGGCTACTTTTTATCGTTTCTCAGACATATTCCTTG
Inf-(SLX4)T2-fw	TAAAAAGTAGCCATGCCCGCTGAAATCAC
RusA FW	GTGAATACCTACAGCATCAC
RusA FW ATG	ATGGTGAATACCTACAGCATC
RusA Rev	TCATTCATTCCCCATTTCCG
Inf RusA FW	ACCCTGTTATCCCTACCTGAGGGTGAATACCTACAGCATCAC
Inf RusA ATG FW	ACCCTGTTATCCCTACCTGAGGATGGTGAATACCTACAGCATC
Inf-(RusA)-T1-rev	GCGGGCATGGTCAATTCATTCCCCATTTCCG

Tabelle 6.3: Fortsetzung.

Inf-(RusA)-T1-fw	GAATGAATGACCATGCCCGCTGAAATCAC
RuvA fw	ATGGTGATAGGCAGACTCAG
RuvA rev	TCATAACGCGGCGCGTAG
RuvB fw	ATGATTGAAGCAGACCGTCT
RuvB rev	TTACGGCATTCTGGCGG
RuvC fw	ATGGCTATTATTCTCGGCATTG
RuvC rev	TTAACGCAGTCGCCCTCTC
(pBo1)-NLS-(RusA) a	ACCCTGTTATCCCTACCTGAGGGCTCCATGCAGCCTTCTCTTAAACGCATG AAAATAGAGCCATCTTCTCAACCTATGAATACCTACAGCATCAC
(pBo1)-NLS-(RusA) b	GTGATGCTGTAGGTATTCATAGGTTGAGAAGATGGCTCTATTTTCATGCGTT TAAGAGAAGGCTGCATGGAGCCCTCAGGTAGGGATAACAGGGT
(NLS)-RusA fw (ATG)	TAGAGCCATCTTCTCAACCTATGAATACCTACAGCATCAC
(pBo1)-NLS-(RuvA) a	ACCCTGTTATCCCTACCTGAGGGCTCCATGCAGCCTTCTCTTAAACGCATG AAAATAGAGCCATCTTCTCAACCTATGATAGGCAGACTCAGAGG
(pBo1)-NLS-(RuvA) b	CCTCTGAGTCTGCCTATCATAGGTTGAGAAGATGGCTCTATTTTCATGCGTT TAAGAGAAGGCTGCATGGAGCCCTCAGGTAGGGATAACAGGGT
(NLS)-RuvA-fw	TAGAGCCATCTTCTCAACCTATGATAGGCAGACTCAGAG
(RuvA)-T2A-NLS- (RuvB) a	CGCGCCGCGTTATGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGT GGAGGAGAATCCCGGCCCTGCTCCATGCAGCCTTCTCTTAAACGCATGAAA ATAGAGCCATCTTCTCAACCTATGATTGAAGCAGAC
(RuvA)-T2A-NLS- (RuvB) b	GTCTGCTTCAATCATAGGTTGAGAAGATGGCTCTATTTTCATGCGTTTAAAGA GAAGGCTGCATGGAGCAGGGCCGGGATTCTCCTCCACGTCACCGCATGTT AGAAGACTTCTCTGCCCTCTCATAACGCGGCGCG
(NLS)-RuvB-fw	CCATCTTCTCAACCTATGATTGAAGCAGACCGTC
Inf-RuvB rev (T2A)	CTCTGCCCTCTTACGGCATTCTGGCGG
(RuvB)-T2A-NLS- (RuvC) a	CCAGAAATGCCGTAAGAGGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGT GGAGGAGAATCCCGGCCCTGCTCCATGCAGCCTTCTCTTAAACGCATGAAA ATAGAGCCATCTTCTCAACCTATGGCTATTATTCTC
(RuvB)-T2A-NLS- (RuvC) b	GAGAATAATAGCCATAGGTTGAGAAGATGGCTCTATTTTCATGCGTTTAAAGA GAAGGCTGCATGGAGCAGGGCCGGGATTCTCCTCCACGTCACCGCATGTT AGAAGACTTCTCTGCCCTCTTACGGCATTCTGG
(NLS)-RuvC-fw	TAGAGCCATCTTCTCAACCTATGGCTATTATTCTCGGCAT
Inf-RuvC rev (T)	GCGGGCATGGTTAACGCAGTCGCCCTCTC
Inf-Terminator fw (RC)	ATCGCGTTAACCATGCCCGCTGAAATCAC
Inf-Terminator rev (V)	GGACGTCTTAATTAACCATGGCTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAG

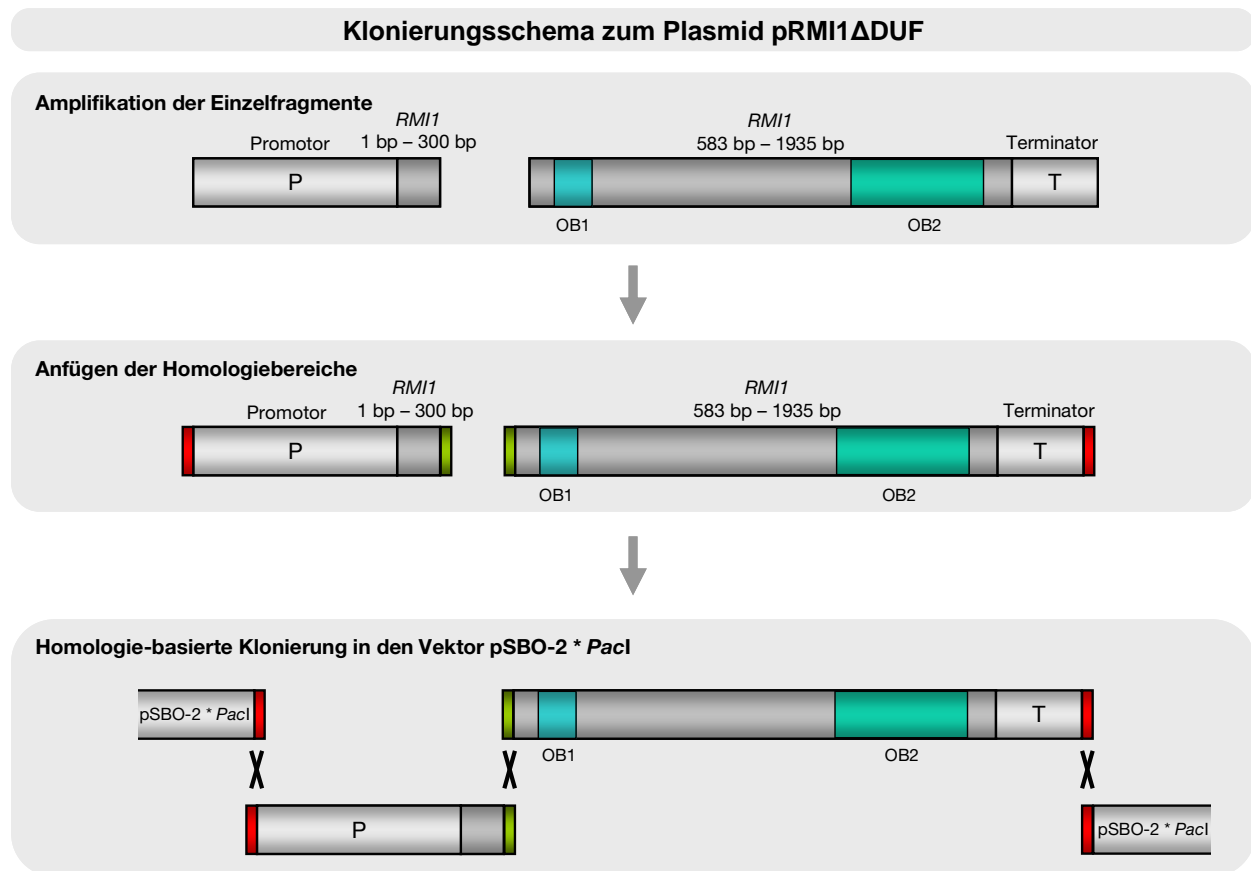
**Tabelle 6.4 Sequenzierungsprimer.** Die aufgelisteten Primer wurden zur Sequenzierung der klonierten Konstrukte verwendet.

Primer	Primersequenz (5'-3')
M13-FW	GTAAAACGACGGCCAGTG
M13-Rev	CACAGGAAACAGCTATGAC
BAR A4	TCGGTGGCACGGCGGATGTC
pZP-Fw-nah	GTATGTTGTGTGGAATTGTG
pZP-Rev-nah	AAACGACAATCTGATCCAAG
RMI1_Prom-rev 1	CGGAAGTGAATTCTCCGGC
RMI1_Prom-fw 1	GTTGGTCTCTCACTAGTCG
SLX1 rev 3	CTGCCTCAAACGTCGTAC
SLX1 fw 3	CTAGATGATGAACAGTTGATG
SLX4 fw (0)	ATGGAACCTCAGAGGGCAC
SLX4 rev (0)	CTACTTTTTATCGTTTCTCAGAC
SLX4 fw 1	GTGAACAGGAGTGGAAGAT
SLX4 fw 4	CTACTAGCAACGACATTATTG
SLX rev 4	GAATCATCATCAGATGATAAG
GEN1 fw 1	CATATGTCACATATCGAGTCTG
GEN1 rev 1	ATCTCCTGTCATCAAACCATC
GEN1 rev 3	GTTTCATGCTGAACGATCC
GEN1 fw 4	CAACACCAAGAGCAACAAC
DMC1P fw 1	GTGAGTCAAATGTCTAATGTGC
DMC1P rev 1	GGATGCATATAGGACCATAGG
RMI2P fw 1	GAGATTTTCGAGGATGTGTTATC
RMI2P rev 1	GGTGTCACAAAGCTATTGATTG
AatII/PiPspI fw	GACGTCTGGCAAACAGCTA
AscI/I-SceI fw	GCCTAGGGATAACAGGGT
RusA rev -0	CAGTATTCGGTAATCGGTC
RusA fw -0	GTTATCTGGCTGAAAGAGG
NLS-RuvB fw	CTTCTCAACCTATGATTGAAG
RuvC-NLS rev	GAATAATAGCCATAGGTTGAG
Terminator rev 1	GGTTTCTTATATGCTCAACAC
pBo1-NLS fw	ACCCTGTTATCCCTACCTG
(T2A)-RuvA rev	CTCTGCCCTCTCATAACG
(RuvA)-T2A fw	CGCGCCGCGTTATGAGA
(T2A)-RuvB rev	CTCTGCCCTCTTACGGC
(RuvB)-T2A fw	CCAGAAATGCCGTAAGAGG
pBo1-T rev	GGACGTCTTAATTAACCATG

**Tabelle 6.5 Real-Time PCR Primer.** Die aufgelisteten Primer wurden zur Quantifizierung der Expression von AtRMI1 oder der Komplementationskonstrukte verwendet.

Primer	Primersequenz (5'-3')
RMI1 RT1 fw	TAGACGGCGCCTGCAAC
RMI1 RT1 rev	AATACCAAAGCTCTGAACAG
Actin2-FW	CAGATGCCCGAAGTCTTG
Actin2-REV	GTGCTGTGATTTCTTTGCTC

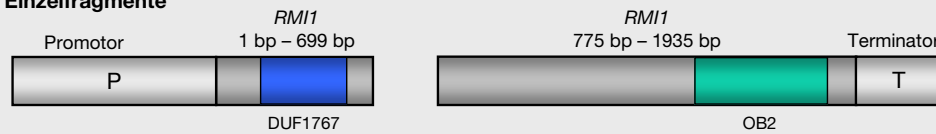
## 6.2 RMI1-Deletionskonstrukte



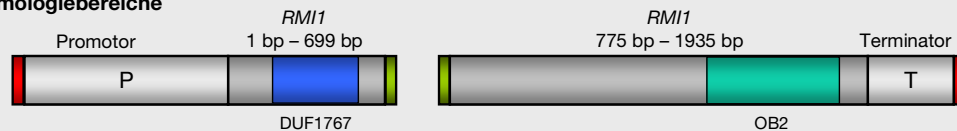
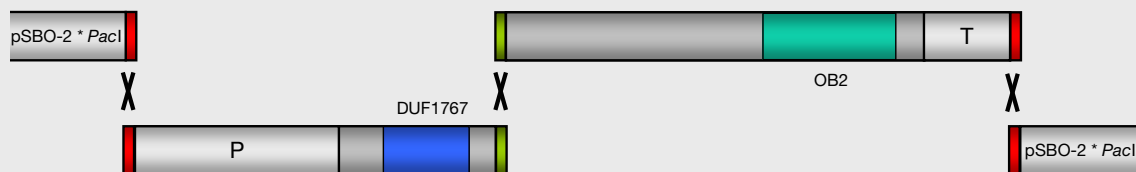
**Abb. 6.1: Klonierungsschema zum Plasmid pRMI1 $\Delta$ DUF.** Die Amplifikation des Promotorbereiches (P) und des *RMI1*-Sequenzbereichs bis zur DUF1767 Domäne erfolgte mit Hilfe des Plasmids pRMI1 (vgl. Abbildung 3.2). Für die Amplifikation des *RMI1*-Sequenzbereichs nach der DUF1767 Domäne und des anschließenden Terminatorbereichs (T) wurde ebenfalls das Plasmid pRMI1 als Matrize verwendet. Im Klonierungsschema sind die verbleibenden konservierten Bereiche der OB-fold Domäne 1 (OB1) und der OB-fold Domäne 2 (OB2) angegeben. Die für die Homologie-basierte In-Fusion<sup>®</sup> Reaktion benötigten homologen Bereiche (farblich markiert), wurden in einer zweiten PCR-Reaktion an die Einzelfragmente angefügt. Zur Herstellung des Vektors pRMI1 $\Delta$ DUF wurde pSBO-2 mit dem Restriktionsenzym *PacI* linearisiert und im Anschluss mit den Einzelfragmenten über die homologen Bereiche rekombiniert. Die Restriktionsschnittstelle für *PacI* blieb dabei beidseitig erhalten.

## Klonierungsschema zum Plasmid pRMI1ΔOB1

## Amplifikation der Einzelfragmente



## Anfügen der Homologiebereiche

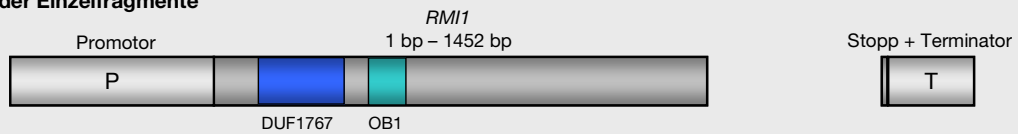
Homologie-basierte Klonierung in den Vektor pSBO-2 \* *PacI*

**Abb. 6.2: Klonierungsschema zum Plasmid pRMI1ΔOB1.** Die Amplifikation des Promotorbereichs (P) und des *RMI1*-Sequenzbereichs bis zur OB-fold Domäne 1 erfolgte mit Hilfe des Plasmids pRMI1 (vgl. Abbildung 3.2). Für die Amplifikation des *RMI1*-Sequenzbereichs nach der OB-fold Domäne 1 und des anschließenden Terminatorbereichs (T) wurde ebenfalls das Plasmid pRMI1 als Matrize verwendet. Im Klonierungsschema sind die verbleibenden konservierten Bereiche der DUF1767 Domäne und der OB-fold Domäne 2 (OB2) angegeben. Zur Herstellung des Vektors pRMI1ΔOB1 wurde pSBO-2 mit dem Restriktionsenzym *PacI* linearisiert und im Anschluss mit den Einzelfragmenten über die homologen Bereiche (farblich markiert) rekombiniert.

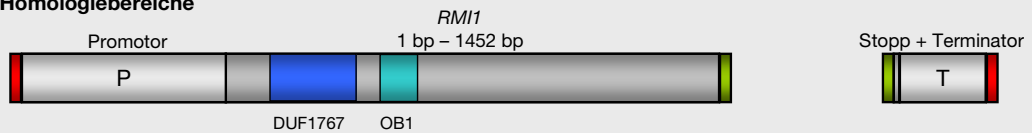


### Klonierungsschema zum Plasmid pRMI1ΔOB2

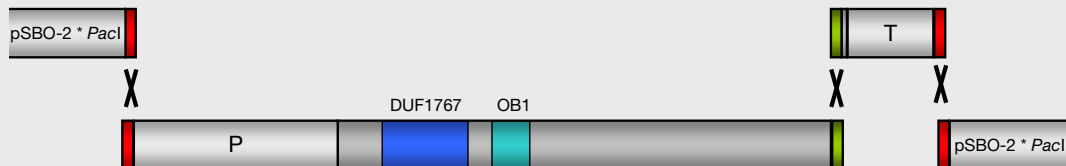
#### Amplifikation der Einzelfragmente



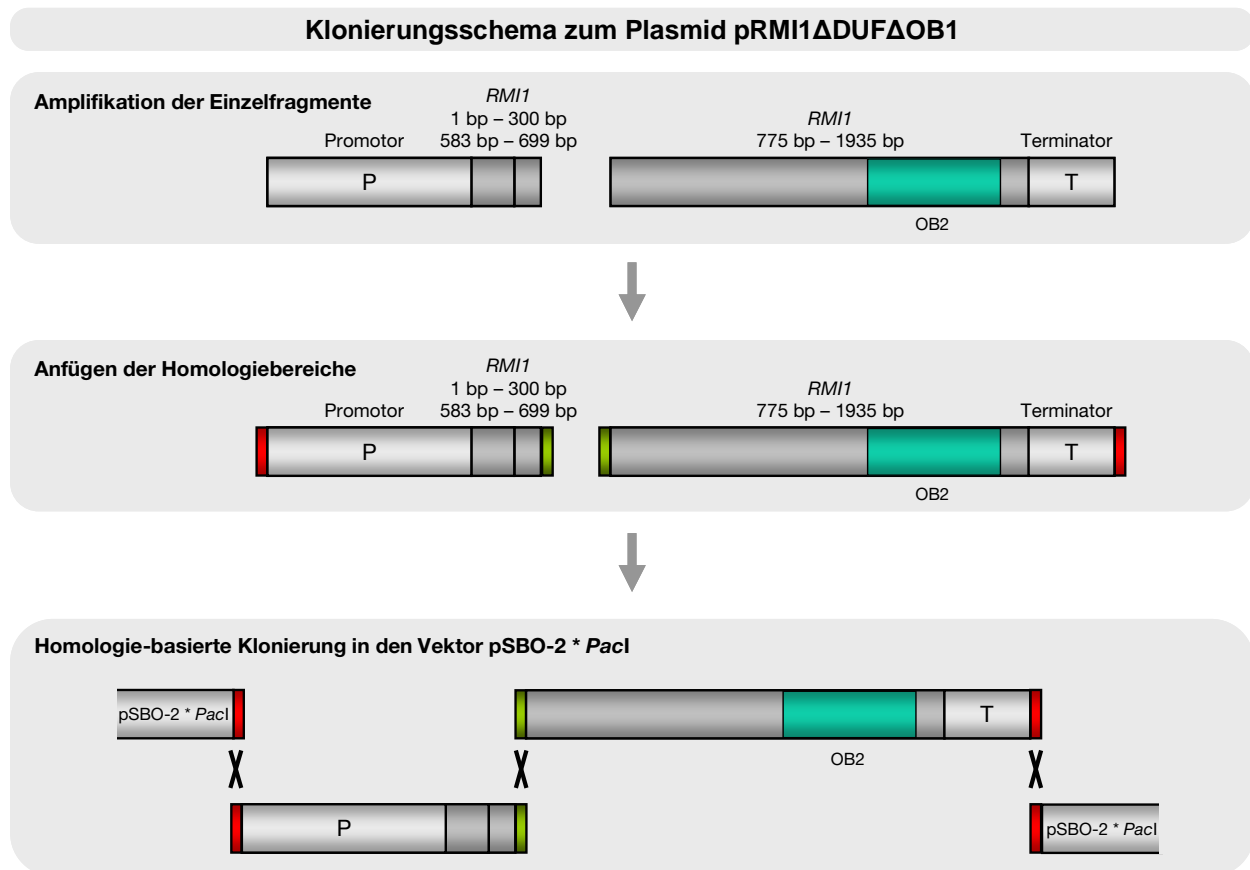
#### Anfügen der Homologiebereiche



#### Homologie-basierte Klonierung in den Vektor pSBO-2 \* PacI



**Abb. 6.3: Klonierungsschema zum Plasmid pRMI1ΔOB2.** Die Amplifikation des Promotorbereiches (P) und des *RMI1*-Sequenzbereichs bis zur OB-fold Domäne 2 erfolgte mit Hilfe des Plasmids pRMI1 (vgl. Abbildung 3.2). Der Sequenzbereich zwischen der OB-fold Domäne 2 und dem Stoppcodon wurde ebenfalls deletiert. Das Fragment aus Stoppcodon und Terminatorbereich (T) wurde auch aus dem Plasmid pRMI1 amplifiziert. Im Klonierungsschema sind die verbleibenden konservierten Bereiche der DUF1767 Domäne und der OB-fold Domäne 1 (OB1) angegeben. Die farblich markierten Sequenz-homologien ermöglichten die Rekombination der Einzelfragmente und des linearisierten pSBO-2 Vektor.



**Abb. 6.4: Klonierungsschema zum Plasmid pRMI1ΔDUFΔOB1.** Die Amplifikation des Promotorbereiches (P) und des *RMI1*-Sequenzbereichs bis zur OB-fold Domäne 1 erfolgte aus dem Plasmid pRMI1ΔDUF (vgl. Abbildung 3.2). Da in diesem Konstrukt die DUF1767 Domäne bereits deletiert war, konnte sowohl der Bereich bis zur DUF1767 Domäne, als auch der Bereich zwischen der DUF1767 Domäne und der OB-fold Domäne 1 in einer PCR Reaktion amplifiziert werden. Der Sequenzbereich nach der OB-fold Domäne 1 einschließlich des Terminatorbereichs (T) wurde bereits für die Klonierung des Plasmids pRMI1ΔOB1 amplifiziert und konnte auch hier eingesetzt werden (vgl. Abbildung 3.6). Das Konstrukt RMI1ΔDUFΔOB1 enthält von den konservierten *RMI1*-Domänen nur noch die OB-fold Domäne 2 (OB2). Zur Herstellung des Vektors pRMI1ΔDUFΔOB1 wurde der linearisierte Vektor pSBO-2 mit den Einzelfragmenten über homologen Bereiche (farblich markiert) rekombiniert.

### 6.3 Expressionsdaten

In den folgenden Tabellen sind die Expressionsdaten zu den Komplementations- beziehungsweise Deletionskonstrukten im Wildtyp IC9C und in der Mutante *Atrmi1-2* IC9C aufgeführt. Die relative normalisierte Expression der einzelnen Linien ist jeweils bezogen auf die Expression von *AtRMI1* im Wildtyp (IC9C) und wurde durch drei unabhängige Experimente ermittelt. Zum Vergleich ist die Expression von *Atrmi1-2* angegeben.

#### 6.3.1 Expression der Komplementations- bzw. Deletionskonstrukte im Wildtyp (IC9C)

**Tabelle 6.6 Expression des Konstruktes RMI1 im Wildtyp.**

	Kontrollen		IC9C::RMI1	
	IC9C	rmi1-2	#782	#783
PCR 1	1	0,3	2,85	27,73
PCR 2	1	0,31	3,38	37,39
PCR 3	1	0,3	3,45	37,73

**Tabelle 6.7 Expression des Konstruktes RMI1ΔDUF im Wildtyp.**

	Kontrollen		IC9C::RMI1 DUF	
	IC9C	rmi1-2	#785	#786
PCR 1	1	0,3	8,20	3,01
PCR 2	1	0,31	9,15	2,85
PCR 3	1	0,3	9,45	3,07

**Tabelle 6.8 Expression des Konstruktes RMI1ΔOB1 im Wildtyp.**

	Kontrollen		IC9C::RMI1 OB1	
	IC9C	rmi1-2	#788	#789
PCR 1	1	0,3	3,59	22,78
PCR 2	1	0,31	3,71	20,98
PCR 3	1	0,3	3,71	22,91

**Tabelle 6.9 Expression des Konstruktes RMI1ΔOB2 im Wildtyp.**

	Kontrollen		IC9C::RMI1 OB2	
	IC9C	rmi1-2	#792	#793
PCR 1	1	0,3	5,06	5,28
PCR 2	1	0,31	5,20	4,96
PCR 3	1	0,3	5,31	5,04

### 6.3.1 Expression der Komplementations- bzw. Deletionskonstrukte in der *Atrmi1-2* Mutante

**Tabelle 6.10 Expression des Konstruktes RMI1 in der *Atrmi1-2* Mutante**

	Kontrollen		rmi1-2::RMI1			
	IC9C	rmi1-2	#463	#464	#466	#474
PCR 1	1,00	0,26	4,62	9,02	12,85	16,43
PCR 2	1,00	0,29	4,97	9,53	14,17	19,54
PCR 3	1,00	0,25	4,82	8,60	11,11	15,18

**Tabelle 6.11 Expression des Konstruktes RMI1 $\Delta$ DUF in der *Atrmi1-2* Mutante**

	Kontrollen		rmi1-2::RMI1 $\Delta$ DUF			
	IC9C	rmi1-2	#496	#497	#498	#505
PCR 1	1,00	0,26	1,54	3,72	0,53	12,65
PCR 2	1,00	0,29	1,60	3,83	0,61	12,85
PCR 3	1,00	0,25	1,40	3,43	0,51	11,36

**Tabelle 6.11 Expression des Konstruktes RMI1 $\Delta$ OB1 in der *Atrmi1-2* Mutante**

	Kontrollen		rmi1-2::RMI1 $\Delta$ OB1			
	IC9C	rmi1-2	#507	#509	#510	#511
PCR 1	1,00	0,26	0,76	14,59	7,35	0,38
PCR 2	1,00	0,29	0,75	14,25	7,55	0,42
PCR 3	1,00	0,25	0,73	12,91	6,88	0,37

**Tabelle 6.11 Expression des Konstruktes RMI1 $\Delta$ OB2 in der *Atrmi1-2* Mutante**

	Kontrollen		rmi1-2::RMI1 $\Delta$ OB2			
	IC9C	rmi1-2	#544	#546	#581	#582
PCR 1	1,00	0,26	28,54	8,76	22,96	2,77
PCR 2	1,00	0,29	21,23	6,15	17,78	1,92
PCR 3	1,00	0,25	17,97	5,79	16,14	1,93

**Tabelle 6.11 Expression des Konstruktes RMI1 $\Delta$ DUF $\Delta$ OB1 in der *Atrmi1-2* Mutante**

	Kontrollen		rmi1-2::RMI1 $\Delta$ DUF $\Delta$ OB1			
	IC9C	rmi1-2	#1309	#1311	#1327	#1328
PCR 1	1,00	0,20	6,39	10,68	1,86	8,25
PCR 2	1,00	0,25	8,96	12,30	1,54	7,36
PCR 3	1,00	0,22	6,32	9,37	1,30	8,25

## **Erklärung**

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen (Botanik II) des Karlsruher Instituts für Technologie in der Zeit vom August 2009 bis Dezember 2012 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

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

Karlsruhe , den 13.12.2013

Simone Bonnet